

平成 27 年度 海外留学補助金による研究経過・成果報告書

キメラ形成能を有する靈長類多能性幹細胞の樹立と応用

The Salk Institute for Biological Studies 山内 隆好

【研究の背景と目的】

これまでに、動物胚の異なる多能性はより未分化な「ナイーブ型」と呼ばれる状態や、より分化した状態に近い「プライム型」と呼ばれる培養皿上の状態として同定されてきた。(Wu and Izpisua Belmonte, 2016)。また、ある動物種の発生過程の胚へ異種の多能性幹細胞を導入しキメラ胚を作るためには、それらの発生段階が近いことが重要だとされてきた。

これまでに、通常の作成手法で樹立されたヒト iPS 細胞はプライム型であるが、ナイーブ型のヒト iPS 細胞の作成手法も選択的に樹立可能であることが報告されてきた(Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014)。ナイーブ型のヒト iPS 細胞は遺伝子改変や細胞の品質管理において有用であることが示されてきた(Gafni et al., 2013)が、ブタやウシといった有蹄類等との異種間のキメラ形成能の向上につながるかどうかについてはよく分かっていない。このことは、(1)ヒトの臓器や組織の異種体内での作成や、(2)異種体内での新たな薬剤スクリーニングの手法の作出や、(3)新たなヒトの疾患モデルの作出といったことへの応用が考えられる(Wu and Izpisua Belmonte, 2015)。従って、有蹄類とのキメラ形成能に関する様々なヒト iPS 細胞を用いた実験的な試みが重要であると考えられるが、これまでにそうしたことが行われてこなかったことから、今回われわれがそれらを検証することとした。

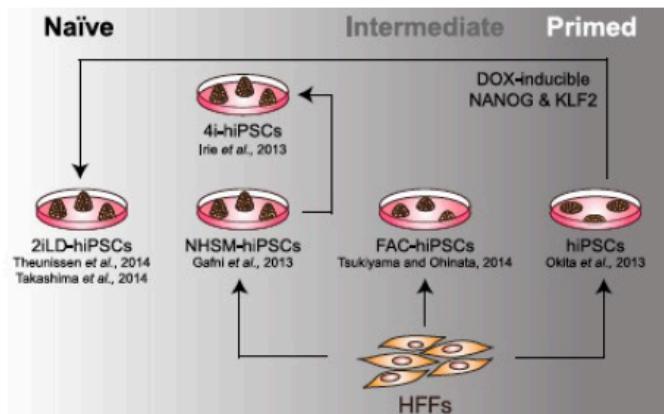
【研究経過】

ナイーブ型、中間型、およびプライム型ヒト iPS 細胞の作製

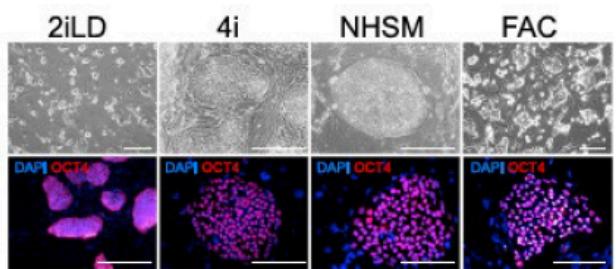
まずわれわれは、これまでに報告されていた様々なタイプ（ナイーブ型、中間型、およびプライム型）のヒト iPS 細胞の作製を試みた（図 1A）。マウスにおけるナイーブ型を維持するための培地（2iL 培地）に転写因子である NANOG と KLF4 をドキシサイクリン（Dox）依存的に発現させるシステム（2iLD）を組み合わせると、ヒト iPS 細胞をより未分化な状態で維持できることが分かった（Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014）。また、プライム型のヒト iPS 細胞もこれまでの報告（Okita et al., 2011）を参考にエピソーマルベクターを用いて作製し、ナイーブ型のヒト iPS 細胞についても過去の報告（Gafni et al., 2013）に従い作製した（NHSM 培地）。また、NHSM 培地とほぼ同じ組成である培地（4i 培地）についても検討を行うこととした（Irie et al., 2015）。また、マウスにおけるエピプラストに特化した bFGF、Activin-A、および CHIR99021 を含む培地（FAC）も試すこととした（Tsukiyama and Ohnata, 2014）。これら 2iLD、NHSM、4i、および FAC システムで樹立したヒト iPS 細胞には蛍光タンパク質である GFP もしくは hKO を恒常に発現するようにレンチウイルス

ベクターを介して処理された。また、これら 4 種類の細胞は全て正常な核型で安定的に維持可能であり（図 1B）、テラトーマ形成能も保持していた（図 1C）。

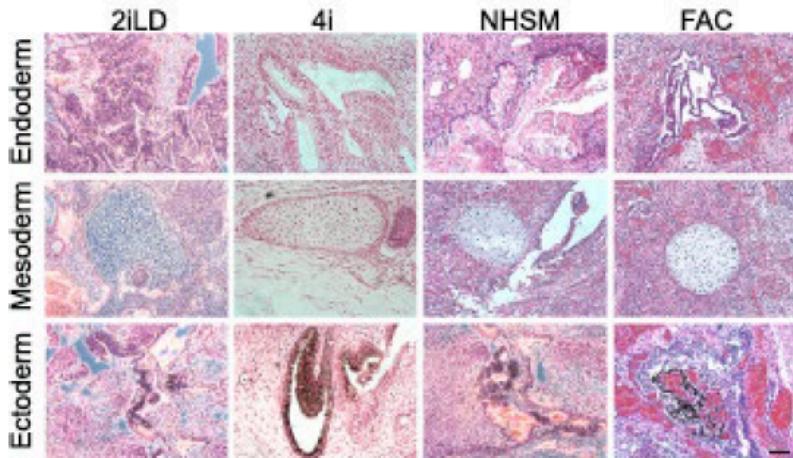
1A



1B



1C

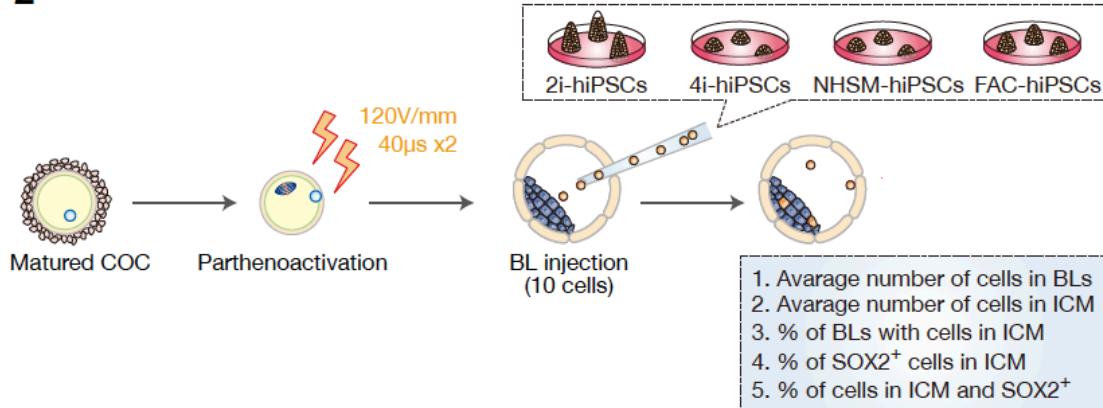


ブタ胚盤胞に対する作製したヒト iPS 細胞とのキメラ形成能の検討

次にわれわれは、作製した 4 種類のヒト iPS 細胞がブタの着床前胚へのキメラ形成能を示すかどうかを検討した。畜殺場において採取した卵巣から得たブタの卵子を培養皿で成長させ、電気的な刺激により発生を促し胚盤胞の段階まで育てた（図 2）。各々の胚盤胞へ 4 種類のヒト iPS 細胞のいずれかを 10 個ずつ注入後、2 日間の培養の後に解析を行った。キメラ形成能の有無は以下 5 つの判断基準①～⑤を用いた（図 2）。①各胚盤胞におけるヒト iPS 細胞の数の平均値、②各胚盤胞の内部細胞塊（Inner Cell Mass, ICM）におけるヒト iPS 細胞の数の平均値、③内部細胞塊にヒト iPS 細胞を有する胚盤胞の割合、④内部細胞塊における多能性のマーカーである SOX2 陽性のヒト iPS 細胞の割合、⑤内部細胞塊におけるヒト iPS 細胞のうち SOX2 陽性であるものの割合。まずわれわれは、前出の 4i 培地や NHSM 培地においてヒト細胞を含んだ胚盤胞が多く（各 28/35、37/44 の割合）、生存率も高かった。また、ヒト細胞を取り込んだ全ての胚盤胞のうち、一つの胚盤胞に平均して 4i 培地では 9.5 個、NHSM 培地では 9.97 個のヒト細胞が存在していた。特に NHSM 培地では 44 個のうち 19 個の胚盤胞は内部細胞塊に取り込まれていたが、4i 培地では 35 個のうち 6 個の胚盤胞のみが内部細胞塊に取り込まれていることが

分かった。また 2iLD 培地や FAC 培地では平均で各 5.7 個、3.96 個のヒト細胞が観察され、各 2.25 個、1.62 個のヒト細胞が一胚盤胞の内部細胞塊に取り込まれていた。ひとたび内部細胞塊に取り込まれると、各培地 (2iLD、4i、NHSMS、FAC) においてそれぞれ 82.2%、72%、60.9%、40% において SOX2 マーカー陽性となっていることが分かった。これらの結果は、プライム型よりもナイーブ型および中間型のヒト iPS 細胞においてブタの胚盤胞に対するキメラ形成能が高いことを示唆していた。

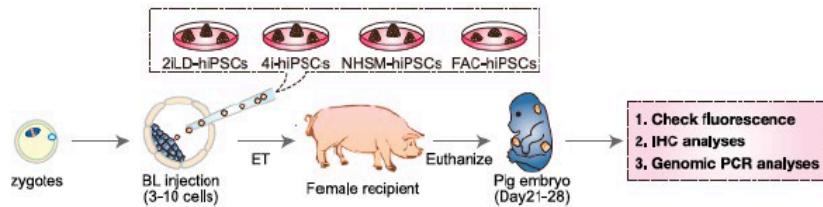
2



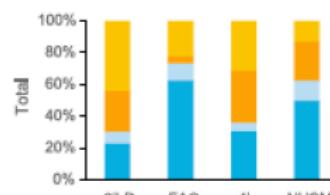
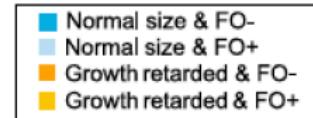
ブタ着床後胚盤胞に対するヒト iPS 細胞のキメラ形成能の検討

次にわれわれは、上記で作成した 4 種類のヒト iPS 細胞が胚移植した後の着床後の発生においてもキメラ胚として取り込まれていくことができるかどうかを検討した。ブタ子宮への移植に供するためのキメラ胚の作出には 67 のドナーとなるブタから 2,181 の胚盤胞を得て、それらの各卵割腔に 3 から 10 個のヒト iPS 細胞を注入した(図 3A)。その後、計 1,466 個のキメラ胚を 41 の仮親となるブタに 30 から 50 個ずつ移植し、18 匹の妊娠成立を確認した。胎生 21 から 28 日目の計 186 の胚を回収したが、ヒト iPS 細胞の培養条件の内訳としては、2iLD 培地から 43 個、FAC 培地から 64 個、4i 培地から 39 個、NHSMS 培地から 40 個であった(図 3B)。これら回収された胎児の半数以上では発生異常が認められたが、FAC 培養液の条件では一番異常の割合が少なかった(図 3C)。ヒト iPS 細胞に導入した蛍光タンパク質(2iLD、および FAC 培地で培養したヒト iPS 細胞では GFP、4i および NHSMS で培養したヒト iPS 細胞では hK0)を基に、67 個の胚でキメラ形成を確認し、その中の 17 個の胚は正常な発生状態であった(図 3B)。一方で、蛍光が観察されなかったキメラ不形成胚では 119 個のうち 82 個が正常な発生状態であったことから、キメラ形成による発生異常の惹起が示唆された。正常な発生を示したキメラ胚のうち、2iLD 培養条件では 13 個中 3 個、FAC 培養条件では 47 個中 7 個、4i 培養条件では 14 個中 2 個、NHSMS 培養条件では 25 個中 5 個の胚において蛍光が認められた(図 3B)。また、2iLD、4i、および NHSMS 培養条件では蛍光強度も弱かったが、FAC 培養条件ではかなり強いシグナルが認められていた(図 3D)。更に、FAC 培養条件にてキメラ形成されたヒト iPS 細胞が TUJ1 や EPCAM、SMA、CK8、HNF3b といった細胞分化マーカーと共に染色されたことから、この培養条件で培養されたヒト iPS 細胞はブタ胚において分化可能であることが明らかとなった(図 3E)。

3A



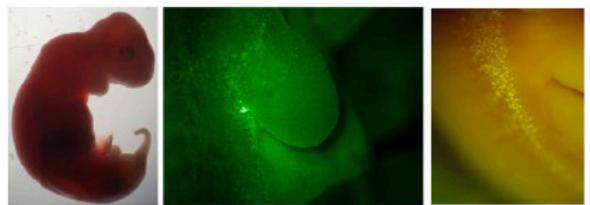
3C



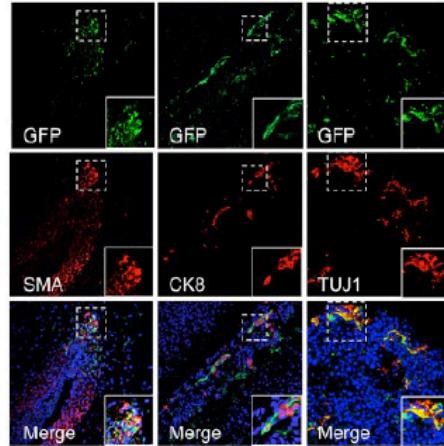
3B

Cell line	Blastocyst origin	Total		Fluorescence positive (FO+)	
		Normal size	Growth retarded	Normal size	Growth retarded
2iLD	Morula/EB	6	13	1	8
	2C	5	0	2	0
	ZG	2	17	0	11
	subtotal	13	30	3	19
FAC	BL	20	6	3	5
	2C	9	4	3	4
	2C	7	2	0	2
	2C	7	1	0	1
	ZG	0	1	0	0
	ZG	2	0	0	0
	PT	2	3	1	2
4i	subtotal	47	17	7	14
	ZG	6	6	0	1
	ZG	6	13	1	5
	ZG	2	6	1	6
NHSM	subtotal	14	25	2	12
	ZG	1	6	0	4
	2C	4	2	1	0
	2C	10	3	2	0
	2C	8	3	1	1
	PT	2	1	1	0
subtotal		25	15	5	5
Total		99	87	17	50
Non-injected		17	0	0	0

3D



3E



【研究成果のまとめ】

これまでに行われてきたマウスをホスト胚とした時のヒト iPS 細胞のキメラ形成は効率の悪いものであると結論付けるのが妥当である (De Los Angeles et al., 2015) が、これについてはヒトとマウスの胚発生の種間差によるものだと考えられるため、今回のマウス以外のホスト動物胚を用いた試みはこの考えに対する幾らかの手がかりを与えた。われわれの結果からは、プライム型よりもナイーブ型および中間型のヒト iPS 細胞においてよりブタの着床前胚に対するキメラ形成能が高いことが分かった。また、ヒト iPS 細胞を注入した後のブタ胚は胚移植後にはかなり低いキメラ形成しか認められなかった。興味深いことは、注入されたヒト iPS 細胞はブタ胚の正常な発生を阻害している可能性が高いと考えられたことである。それでも FAC 培地で培養された中間型のヒト iPS 細胞は着床後ブタ胚において高いキメラ形成能を示した。今後は、ラットとマウス間で見られた異種体内での臓器作成の例 (Kobayashi et al., 2010) のように、ブタの体内でヒト iPS 細胞から臓器作成が可能かどうかを調べていくことが課題となる。それに伴い、異種間での発生のタイミングを合わせるための研究や、より高いキメラ形成能を有するヒト iPS 細胞の作出、更にはヒトに近縁な種の検討といったことが考えられる。今回はヒ

トープタ間のキメラ形成率がとても低いという結果であったが、ヒト iPS 細胞と有蹄類を用いた胚盤胞補完法に対する初めての試みであり、今後更に研究が進めばヒト胚の発生についての理解や動物の体内におけるヒト臓器の薬剤試験、病態の研究、臓器移植等に役立つ可能性がある。

【研究成果】

Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, Sugawara A, Gil MA, Yamauchi T, Suzuki K, Bogliotti YS, Cuello C, Morales Valencia M, Okumura D, Luo J, Vilariño M, Parrilla I, Soto DA, Martinez CA, Hishida T, Sánchez-Bautista S, Martinez-Martinez ML, Wang H, Nohalez A, Aizawa E, Martinez-Redondo P, Ocampo A, Reddy P, Roca J, Maga EA, Esteban CR, Berggren WT, Nuñez Delicado E, Lajara J, Guillen I, Guillen P, Campistol JM, Martinez EA, Ross PJ, Izpisua Belmonte JC. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell* 2017, 168(3):473-486.

Wu J, Yamauchi T, Izpisua Belmonte JC. An overview of mammalian pluripotency. *Development* 2016, 143(10):1644-1648. doi: 10.1242/dev.132928.

【参考文献】

Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y.-S., Usui, J., Knisely, A.S., et al. (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142, 787–799.

Wu, J., and Izpisua Belmonte, J.C. (2016). Stem cells: a renaissance in human biology research. *Cell* 165, 1572–1585.

Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yo- sef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., et al. (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504, 282–286.

Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficz, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., et al. (2014). Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* 158, 1254–1269.

Theunissen, T.W., Powell, B.E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D.A., Reddy, J., Fan, Z.P., Maetzel, D., Ganz, K., Shi, L., et al. (2014). Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive hu- man pluripotency. *Cell Stem Cell* 15, 471–487.

Wu, J., and Izpisua Belmonte, J.C. (2015). Dynamic pluripotent stem cell states and their applications. *Cell Stem Cell* 17, 509–525.

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* 8, 409–412.

Irie, N., Weinberger, L., Tang, W.W.C., Kobayashi, T., Viukov, S., Manor, Y.S., Dietmann, S., Hanna, J.H., and Surani, M.A. (2015). SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 160, 253–268.

Tsukiyama, T., and Ohinata, Y. (2014). A modified EpiSC culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice. *PLoS ONE* 9, e95329.

De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H.G., et al. (2015). Hallmarks of pluripotency. *Nature* 525, 469–478.