

# 研究報告書

## 「ウサギを用いた iPS 細胞総合(完結型)評価系の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 本多 新

### 1. 研究のねらい

本研究は、多能性幹細胞を用いたヒト医療を開発することを最終目標として、倫理・安全性などの観点からヒトでは不可能もしくは困難な研究を『ウサギ』で行うことに特徴がある。マウスやラットのような扱いやすさと同時にヒトとの類似性をも兼ね備えたウサギで、ヒト多能性幹細胞研究を後押しする。

具体的な項目としては、

- ① ヒト型多能性幹細胞を生じるウサギで iPS 細胞を樹立する。
- ② 樹立した iPS 細胞を ES 細胞と比較することによりその相違を解析する。
- ③ iPS 細胞の質を高めるような処理を施し、キメラウサギ作製に挑む。
- ④ 質を高めた多能性幹細胞で体外分化誘導を行い、幹細胞の質的な評価法を確立する。
- ⑤ ウサギで得られた知見をヒト iPS 細胞研究へと応用し、病因の解明や新しい治療法の開発に役立てる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

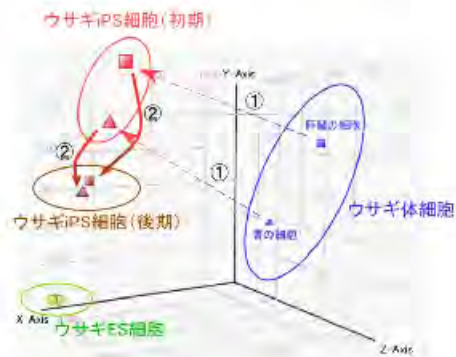
本研究課題採択当初、我々はすでにウサギ ES 細胞の樹立とその解析により、ウサギ多能性幹細胞が naïve ではなく primed(EpiSC タイプ)であることを掴んでいたことから、ウサギで iPS 細胞を樹立することが出来れば、ヒト多能性幹細胞のモデルとして、効果的な研究が展開できると考え研究を開始した。いくつかの試行錯誤の末に、世界初となるウサギ iPS 細胞(Honda et al. 2010)の樹立に成功し、マウスやヒトの多能性幹細胞との類似性や相違点に着目して解析した。実際には、網羅的な遺伝子発現解析から ES 細胞と iPS 細胞における質の相違などについても、確認することに成功した(Honda et al. 2011)。マウスと同様の扱いやすさを誇りながら、ヒト型多能性幹細胞を生じる実験動物はウサギだけと言って良く、ヒトでは不可能なキメラ作製実験や移植実験などもヒト型幹細胞モデルとして容易に展開できる。最近では、primed のウサギ多能性幹細胞をより質の高い幹細胞種(naïve-like)へと変換する技術開発にも成功し、iPS 細胞の質の低さを改善することにも成功している。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A「ウサギ iPS 細胞の樹立」

胚性および成熟ウサギの繊維芽細胞から iPS 細胞の樹立を試みたが、その非常に激しい増殖率のために成功には至らなかった。そこで、比較的増殖活性の低い成熟ウサギの胃と肝臓の細胞を用いたところ、ウサギ iPS 細胞の樹立に成功した。樹立した iPS 細胞は各種未分化マーカー陽性で体外および体内で三胚葉性の分化が可能であった。ウサギは

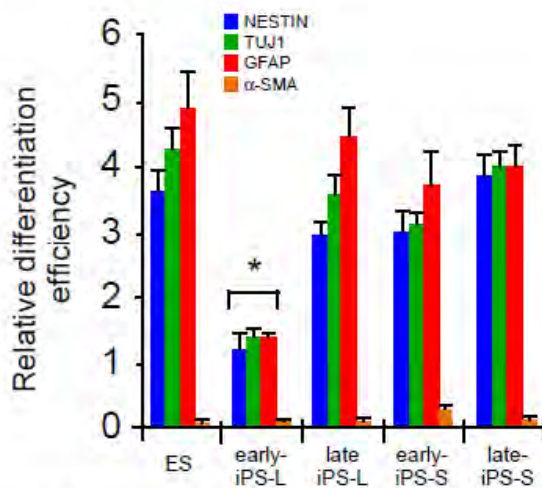
iPS 細胞の比較対象として ES 細胞も容易に樹立できることが特徴の一つであるため、iPS 細胞と ES 細胞との比較に焦点を当てた解析も進めた。ウサギ ES 細胞、肝臓由来の樹立初期・後期 iPS 細胞、および胃由来の樹立初期・後期 iPS 細胞における遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、iPS 細胞は継代などにより外来因子(山中因子)の発現が抑えられ安定化するにつれて、ES 細胞の発現状況に近づくものの、やはり ES 細胞とは質的に異なるということが明らかになった(図1)。これまでの世界的な研究から、ヒト iPS 細胞はその不完全な初期化により、ヒト ES 細胞に比べて質が劣る場合が多く、再生医療実現の懸念材料となっているが、ウサギ iPS 細胞にも同様の不安定性があることが判明した。このことから、ウサギは実験動物としてマウスと同様の扱いやすさと、ヒトと類似した ES/iPS 細胞を樹立できるという優れた特徴を合わせ持つことを証明できた。



(図1)ウサギES細胞とiPS細胞における遺伝子発現パターンの相違:iPS細胞は継代に伴いES細胞の遺伝子発現パターンに類似していく(②)が、安定化したiPS細胞でもES細胞とは明確な相違が残存した。

#### 研究テーマ B「ウサギ iPS 細胞の神経分化誘導による比較」

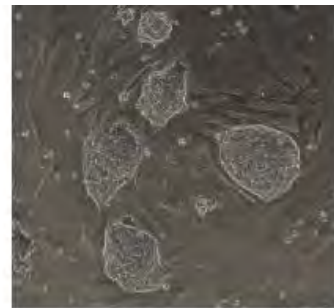
ウサギ iPS 細胞の樹立により、その遺伝子発現状況には ES 細胞との明確な相違が確認されたが、そのような相違が iPS 細胞の分化誘導能にどのように反映されてしまうのかを解析した。我々はヒトやマウスにおいて体外分化誘導システムが発達している神経系列細胞への誘導を、ウサギ多能性幹細胞に適用した。まずは、ウサギ ES 細胞を用いて、条件検討をすることにより、非常に定量性の高い神経幹細胞、神経繊維、アストロサイトなどへの体外分化誘導システムを構築した。続いて、各種 iPS 細胞における神経系列細胞への分化能を ES 細胞と比較したところ、肝臓由来の樹立初期 iPS 細胞において有意に分化能が劣ることが判明した。しかしながら、樹立後期の iPS 細胞であれば肝臓由来のものであっても ES 細胞と同様の分化能を獲得できることが明らかとなった(図2)。さらに、より分化誘導の困難なオリゴデンドロサイトへの分化を誘起したところ、樹立後期の iPS 細胞であっても ES 細胞と同様の効率で分化させることはできなかった。これは、ES 細胞と iPS 細胞の根本的な質的相違が、オリゴデンドロサイトのようなターゲットに分化誘導することにより顕在化したと言える。



(図2)神経系列への体外分化誘導能評価:神経系への分化能は肝臓由来樹立初期(early-iPS-L)で有意に低かった。

#### 研究テーマ C「ウサギ iPS 細胞の naïve-like 変換」

多能性幹細胞にはキメラ形成能や生殖細胞への分化能を有する、非常に質の高い naïve と呼ばれるタイプ(おもにマウス・ラットから樹立される)と、三胚葉性の分化能は有するものの、キメラ形成能に乏しい primed と呼ばれるタイプ(マウス・ラット以外の動物種から樹立される)に分類できることが知られている。Naïve と呼ばれる多能性幹細胞は primed と呼ばれるものよりも質的に上位であると考えられており、もともと primed であるヒト多能性幹細胞を naïve タイプに変換することができれば、幹細胞としての質を土台から向上させることとなり、より複雑な細胞や組織への高効率の分化誘導さえ可能となると期待されている。しかし、「真の naïve」としての特徴を明らかにするためには、naïve タイプとして変換した細胞のキメラ形成能を評価することが必要不可欠であり、primed の多能性幹細胞を生じながらもキメラ作製実験を容易に展開できるウサギを用いることが有効である。そこで、ウサギで樹立した iPS 細胞を naïve タイプに変換することを試みた。Oct3/4 遺伝子の強制発現維持や培養環境の改変により、形態的にマウスの多能性幹細胞によく似たコロニーを形成することに成功した(図3)。現段階ではこの細胞を用いてキメラ産仔を得るに至っていないため naïve-like 細胞と命名した。この細胞は体外および体内での三胚葉性分化能も保持しているだけでなく、初期胚に注入すれば高効率で胚盤胞期胚の内部細胞塊に寄与することが確認された。さらに、神経系への分化誘導を行ったところ、胃由来の iPS 細胞を naïve タイプへ変換した場合、量的だけでなく質的にも ES 細胞を越えうる能力を獲得することが示唆された。



(図3) Naive-likeタイプへと変換したウサギiPS細胞

### 3. 今後の展開

今後も引き続き、ウサギ多能性幹細胞のキメラ形成能に重点を置いた研究を続ける。具体的には、導入遺伝子の検討や培養条件の改変により検討する。多能性幹細胞の質的な向上はキメラ形成能だけでなく、体外分化誘導能での評価も積極的に行う予定である。最終的には、ES細胞と相違のない iPS 細胞の質を獲得させることを目指す。ウサギ多能性幹細胞で得た知見は、サルやヒトの多能性幹細胞に応用する。疾患由来 iPS 細胞なども、naïve タイプなどへの変換により primed の際には見いだすことの出来なかった特徴を明らかにすることも可能であろう。ウサギだけでなくマウスやサルを含めた複数種類の動物を用いて、生命科学の発展だけでなくヒトの医療に発展するような研究で貢献したい。

### 4. 自己評価

本研究の最終目標はウサギからヒトへの研究展開であり、そのような観点から客観的に判断すると、まだヒトへの展開には時間がかかると言わざるを得ない。しかしながら、キメラ作製を基軸とした解析システムや、神経系への体外分化誘導による比較システムなどを構築することに成功しており、一步ずつ着実に前進している。また、疾患 iPS 細胞を用いた本研究領域研究者との共同研究も進み始めており、予想以上の発展も見込まれる。異動に伴い神経系への分化誘導とその評価に関する論文発表に時間がかかっていることも懸念材料であるが、追加実験の多くを異動先の宮崎大学で行うことができ、システムの構築にも役だった。今後は、本研究領域で培った人脈なども大切にしながら、トランスレーショナルリサーチの発展に貢献したい。

## 5. 研究総括の見解

計画されたプロジェクトは比較的単純で、ウサギというモデル動物を iPS も含め、様々な胚操作が可能な系に仕上げるというものである。プロジェクトに参加する以前から ES 細胞樹立などを進めており、全体のシステムを構築するという長いスパンの期待を込めて採択している。期間中にウサギ iPS の樹立を行い、論文に報告した事、またナイーブ状態の iPS 作製への手がかりを得ている事、更にキメラ系性能を持つ iPS の作製のための準備など、着実に研究が進んでいる。今後も、ウサギの胚操作の中心研究者となるよう、これまでの研究を地道に進めることを希望する。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. **Arata Honda**, Michiko Hirose, Masanori Hatori , Shogo Matoba, Hiroyuki Miyoshi, Kimiko Inoue, Atsuo Ogura. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285: 31362-31369

### (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)

#### 主要な学会発表

1. 2012年9月10日 Honda A, Hirose M, Hatori M, Ogura A. Development of ES/iPS cell research using rabbits. The 2nd Japan-Czech Joint Symposium(東京)
2. 2011年7月1日 Honda A. Generation and quality assessment of pluripotent stem cells in rabbits. The 4th International rabbit biotechnology meeting (Hungary)

#### 著作物

1. Arata Honda., Isolation and culture of rabbit embryonic stem cells. *Methods in Molecular Biology* “Epiblast Stem Cells: Methods and Protocols” (in press)

#### 受賞

1. 平成23年5月26日 第58回日本実験動物学会総会  
日本実験動物学会奨励賞(受賞者氏名:本多 新)  
タイトル:実験動物の新規幹細胞の樹立技術と利用法の開発  
表彰主催団体:(社)日本実験動物学会

#### プレス発表

1. 平成22年8月6日 ウサギ iPS 細胞の樹立に世界で始めて成功  
—再生医療研究に向け「ヒト型」の新細胞材料を提案—



(<http://www.riken.go.jp/r-world/research/results/2010/100806/index.html>)