

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製・制御等の医療基盤技術
2. 研究開発課題名：ヒト iPS 細胞の高品質化とその検証・応用
3. 研究開発代表者：自治医科大学先端医療技術開発センター センター長・教授 花園豊
4. 研究開発の成果

目的：iPS 細胞には、異なる発生段階を反映する 2 種類が存在する。ES 細胞型(ナイーブ型)とエピ幹細胞型(プライム型)である。iPS 細胞を動物初期胚に導入してキメラ形成できるのはナイーブ型である。現行のヒト iPS 細胞はプライム型である。ヒト iPS 細胞を動物初期胚に導入して動物体内でヒト臓器を作る動きがあるが、(1)これには iPS 細胞のナイーブ化が必須であり、その樹立が望まれる。また、(2) iPS 細胞の実用化に向けては、齧歯類に加え大型動物評価系 [(2a)ヒツジ、(2b)ブタ] が必要である。

結果等：(1) ナイーブ化 (花園 G)：まずブタ iPS 細胞を作製した(Fujishiro S et al, Stem Cells Dev 2013)。次に、それをナイーブ型へと高品質化した。こうして得られたブタ iPS 細胞のキメラ形成能をマウス胚盤胞に移入して検討したところ、E9.5、E10.5、E11.5 異種間キメラマウスを複数採取することができた。キメラ形成は、蛍光顕微鏡にて赤色蛍光およびブタミトコンドリア DNA の検出によって確認した。PCR では胎仔や羊膜で高頻度にブタ mtDNA を検出した。すなわち、異種間キメラ胚が形成されたことが示された(特願 2014-203679、PCT/JP2015/078699)。同様の方法によってサル ES 細胞から増殖能や形状が良好なコロニーを単離した(特願 2016-75758)。

(2a) ヒツジ (花園 G)：ヒト iPS 細胞からどのくらい造血幹細胞が出来るかどうかを検証するには、動物を用いた造血再構築実験が必須である。従来、免疫不全マウスを用いた評価が一般的であった。今回、ヒツジ胎仔を用いたヒト造血幹細胞の定量的な評価系を開発した(Abe T et al, Exp Hematol 2012, Exp Anim 2014)。本法によって、HoxB4 遺伝子を導入したヒト造血幹細胞は、対照群に比べて造血再構築能が 4.8 倍高いことがわかった。この系ではヒト造血の定量的観察を長期的に(3 年以上にわたって)実施できた。さらに、ヒト iPS 細胞を本システムに投入して、ヒト造血幹細胞を分化誘導できることがわかってきている(特願 2015-168702)。

(2b) ブタ (長嶋 G)：IL2 受容体 γ 鎖遺伝子のノックアウトによって、X 染色体性重症複合型免疫不全症(X-SCID、以下 SCID)のブタの作出に成功した(Watanabe M et al. PLoS One 2013)。しかし、SCID ブタは、生殖月齢まで生存することは困難であり、したがって繁殖は困難である。そこで、SCID ブタの繁殖法を開発した。すなわち、胚盤胞補完により SCID ブタと健常ブタとのキメラ個体を作成した。これにより、IL2 受容体 γ 鎖遺伝子欠損という変異を有しながら正常な免疫系が補完されるので、正常発育が可能な SCID キメラブタを作成できた(特願 2014-078986、PCT/JP2014/ 076768)。この個体を繁殖に供して、SCID ブタの繁殖を実現できる見込みである。

図．高品質化したブタ iPS 細胞由来のブタ・マウスキメラ

ブタ iPS 細胞をマウス胚盤胞に移植してブタ・マウスキメラ胚を作成し、それを BZ-X700 蛍光顕微鏡 (Keyence) で観察した際の Sectioning 画像を示す。ブタ iPS 細胞は赤色蛍光遺伝子で標識されている。A-C：ブタ・マウスキメラ胚 (E10.5)、D：コントロールマウス胚 (E10.5)。

