

piggyBac システムを用いた簡便で効率的な iPS 細胞誘導法の開発と 培養条件評価系への応用

築山 智之

(京都大学大学院農学研究科生殖生物学分野)

多能性幹細胞と培養条件

ヒト iPS 細胞の樹立は、多能性幹細胞を用いた細胞移植医療の実現へ向けた大きなブレークスルーであったが、ヒトにおける実際の臨床応用実現のためには、ブタやイヌなどの大型哺乳動物を用いた前臨床試験が必須となる。しかし、これらの動物種においては、iPS 細胞誘導のために導入した外来因子の発現に依存しないで多能性状態を維持できるような、完全にリプログラミングを受けた iPS 細胞は未だ得られておらず、分化誘導実験や疾患モデル作製に支障をきたすと考えられる。また、マウス ES 細胞の樹立から約 30 年、ヒト ES 細胞の樹立から 10 年以上が経過した現在においても、マウスおよびラット以外の動物種において、生殖細胞寄与能をもつような多能性を有する ES 細胞株の樹立に関する報告は皆無といってよい。これは、多能性幹細胞を樹立・維持するための適切な培養条件がそれらの動物種においては確立されていないことが原因であると考えられ、培養条件を評価する実験系の構築が求められている。

近年、マウスとヒトの多能性幹細胞の差異に関する研究が進んでいるが、これらは細胞の培養条件、形態、増殖、表面抗原、遺伝子発現、エピジェネティックな状態、キメラ寄与能、生殖細胞への分化能等、多くの点で性質が異なることが判明している¹⁾。このことから、マウス型の多能性幹細胞はヒト型の多能性幹細胞と比べ、より未分化な多能性の“基底状態”にあることが示唆されており、ヒト型の多能性幹細胞はむしろ、マウスのエピプラスト由来の幹細胞であるエピプラストステムセル (EpiSC) に対応する細胞種であると考えられている²⁻⁴⁾。一方で、ヒト iPS 細

胞は、マウス iPS 細胞と同じ四つのリプログラミング因子 (山中ファクター: *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) 導入によって得られること、また、ヒト ES 細胞用の培地では樹立できるが、マウス ES 細胞培地では樹立できないことも知られている⁵⁾。このことから、リプログラミング因子の導入によって、体細胞を多能性の前駆状態に導くことは可能であるが、リプログラミング途中の培養条件によって細胞の最終的な多能性のキャラクターは大きく異なると考えられる。つまり、リプログラミング途中の培養条件こそが、細胞の最終的な多能性のキャラクターを決定づけると言い換えることができる。そこで、iPS 細胞樹立系を用いることによって、マウス ES 細胞のような真の多能性基底状態にある多能性幹細胞株を様々な動物種において樹立するための培養条件をスクリーニングできると考えた。

レトロウイルスを用いた培養条件評価系

我々はまず、様々な動物種(マウス、ヒト、サル、ブタ、イヌ、ラット、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ヤギ)由来の線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* および赤色蛍光タンパク質 (*DsRed*) を導入し、様々な増殖因子、化合物などの添加物を含む ES 細胞培地で培養した。多能性を獲得した細胞は、レトロウイルスをサイレンシングすることが知られており⁶⁾、*DsRed* のサイレンシングを多能性獲得の指標として、体細胞へのリプログラミング誘導を観察した。この方法によって、外来因子の発現に依存する不完全な多能性状態にある iPS 前駆細胞が、外来因子に非依存的な多能性の基底状態を獲得し、安定的に維持可能な培養条件をスクリーニングできると考えた。しかし、この手法の場合、1) 遺伝子導入の成否の判断が難しく、*DsRed* 陰性のコロニーが必ずしも外来因子のサイレンシングの結果を示しているとはいえない、2) 四つの多能性誘導因子を個別に体細胞に導入しているため、出現したコロニーが必ずしも四つの因子すべてをもつわけではなく、コロニーの多様性が増し、目的とするコロニーの選抜が難しい、3) レトロウイルスによって挿入された外来

Development of a simple and efficient method for generation of iPS cells by using piggyBac system to screen novel culture conditions

Tomoyuki Tsukiyama (Laboratory of Reproductive Biology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-Cho, Sakyo-Ku, Kyoto 606-8502, Japan)

テクニカルノート

導入遺伝子の発現はLTR領域のプロモーター活性に依存し、人為的な制御が難しいことから、真に多能性を有するコロニーの選抜が困難であり、外来遺伝子が再活性化する恐れがある、という問題が生じた。

新たな培養条件評価系の開発

そこで我々は、新たに以下のような培養条件評価系の構築を試みた。1) 体細胞が多能性を獲得する指標として、マウス初期胚や未分化ES細胞で高発現しているEarly Transposon (ETn) 由来のプロモーターに、*Oct3/4*のエンハンサー内の保存領域 (conserved region, CR) を三量化して連結することで、未分化多能性幹細胞だけで特異的にEGFPおよびPuromycin耐性遺伝子を発現するレポーター (EOSレポーター) を用いる⁷⁾、2) リプログラミング因子を複数搭載したポリシストロニックベクターを用いる、3) レトロウイルスの代替として、最終的に導入遺伝子をゲノムから削除できるpiggyBac (PB) トランスポゾンシステムを遺伝子導入に用いる^{8,9)}、4) ドキシサイクリン (Dox) により遺伝子発現のON/OFFが可能な遺伝子発現誘導システムを用いる、という改良を加えた (図1)。

EOSレポーターはGFPの発現制御に種間で保存された領域を使用しており、マウスおよびヒトの多能性幹細胞において機能することが示されている⁷⁾。このことから、様々な動物種において多能性細胞の選抜指標として使用できることが示唆される。また、Dox誘導遺伝子発現システムを用いることにより、培地中からDoxを除去することで、出現するコロニーが外来因子に依存することなく多能性を誘導・維持できるか判定できる (図1)。

我々は、まず、*Oct3/4*、*Klf4*、*Sox2*の3遺伝子をこの順番で、単一mRNAからの複数タンパク質発現を可能にする自己開裂ペプチドである2Aペプチドにより接続したコンストラクトが、Dox誘導遺伝子発現システムによって発現制御を受けるポリシストロニックPBベクター (OKSベクター、図2-A) を構築した。同様に、*c-Myc*がDox誘導遺伝子発現システムによって発現制御を受けるPBベクター (*c-Myc*ベクター、図2-A) を構築した¹⁰⁾。

OKSベクターのみ、OKSベクターと*c-Myc*ベクターの組み合わせを用いた場合のリプログラミング効率を、以前に報告されているMKOSベクター (*c-Myc*、*Klf4*、*Oct3/4*、*Sox2*の4遺伝子をこの順番で2Aペプチドにより接続したコンストラクトがDox誘導遺伝子発現システムによって発現制御を受けるポリシストロニックPBベクター、図2-A) を用いた場合と比較した。また、マウスでは、*c-Myc*の代替として形質転換活性の低い*L-Myc*を用いることにより、ジャームライントランスミッション能を持

つ高品質なiPS細胞を高効率で樹立できることが報告されていることから¹¹⁾、我々も同様のことをPBベクター系で検証した。すなわち、*L-Myc*がDox誘導遺伝子発現システムによって発現制御を受けるPBベクター (*L-Myc*ベクター、図2-A) あるいはOKSの下流に2Aペプチドで*L-Myc*を接続したDox誘導PBベクター (OKS_LMベクター、図2-A) を構築し、リプログラミング効率を比較検討した。この際、あらかじめ*Oct3/4*-GFPレポーターを導入したマウス胎仔線維芽細胞を用い、リプログラミング効率を比較したところ、OKSベクターと*c-Myc*ベクターの組み合わせが、*c-Myc*を同一ベクターにもつMKOSベクターを用いた場合と比較し、有意に多数のES細胞様コロニーが出現することが示された¹⁰⁾。一方、これらのコロニーの大部分は、Dox存在下で外来遺伝子発現が誘導されている時には、多能性獲得の指標として用いた*Oct3/4*-GFPが陰性のままであり、Doxを除去して外来遺伝子発現を抑制することで、*Oct3/4*-GFPが陽性に変化することが明らかとなった¹⁰⁾。また、適切な時期に外来遺伝子発現を抑制した場合のリプログラミング効率は平均 $0.27 \pm 0.05\%$ であり、従来のレトロウイルスを用いた手法よりも (約0.01–0.1%) 約30倍高いことが示された¹⁰⁾。また、OKSベクターと*L-Myc*ベクターの組み合わせでも、MKOSベクターを用いた場合よりも高い効率でES細胞様コロニーが出現し、*Oct3/4*-GFPの陽性コロニーも多く得られることが明らかとなった¹⁰⁾。

次に、上記で構築したiPS細胞樹立系にEOSレポーターによる選抜を組み合わせ、高品質なiPS細胞を樹立できるか評価した。すなわち、EOSレポーターを搭載したPBベクター (PB-EOSレポーター、図2-A) とともに、OKSベクターと、*c-Myc*ベクターあるいは*L-Myc*ベクターの2種類の組み合わせをマウス胎仔線維芽細胞に導入した。Dox存在下で培養し、出現してくるコロニーを継代したところ、マウスES細胞様の形態をもつiPS細胞が樹立された (図2-B)¹⁰⁾。これらの細胞株は、様々な多能性関連遺伝子を発現する一方、線維芽細胞特異的遺伝子が抑制され、胚様体およびテラトーマ形成を介して三胚葉に分化した¹⁰⁾。また、CAGプロモーター発現制御下で恒常的に赤色蛍光タンパク質を発現するレポーターを搭載したPBベクター (PB-RFPレポーター、図2-A) を共に導入したマウスiPS細胞を樹立し、胚盤胞期胚に注入したところ、iPS細胞が高度に寄与するキメラマウスが得られ、さらに生殖細胞への分化が確認された (図2-CおよびD)¹⁰⁾。以上のことから、EOSレポーターと多能性4因子を導入したPBベクターを用いて、真の多能性基底状態にあるiPS細胞が樹立できることが明らかとなった。よって、こ

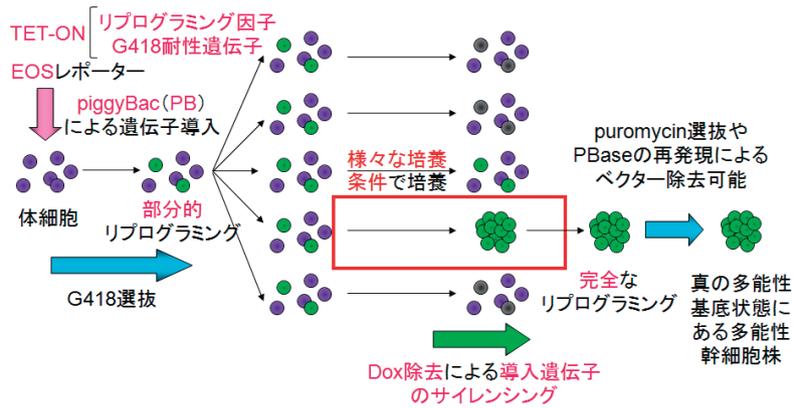


図1 真の多能性幹細胞株を得るための多能性細胞選択戦略

Dox 誘導遺伝子発現システムによって発現制御を受けるリプログラミング因子および Neomycin 耐性遺伝子と、EOS レポーターを PB トランスポゾンによって同時に体細胞に導入する。これらの細胞を Dox 存在下で培養して、導入遺伝子の発現を誘導する。また、G418 選抜によってリプログラミング因子導入細胞を濃縮できる。リプログラミング因子の強制的発現によって、部分的なリプログラミングを受けた細胞を複数のウェルに継代した後、増殖因子、血清代替物、分化制御関連化合物、ペプチド、フィーダー細胞および細胞外マトリックスなどの種々の因子を様々な組み合わせで添加した培養条件を、EOS-GFP レポーターに陽性を示す細胞数によって検定することにより、細胞が完全なリプログラミングを受け、多能性基底状態にある幹細胞株を樹立するのに最適な培養条件をスクリーニングできると考えられる。

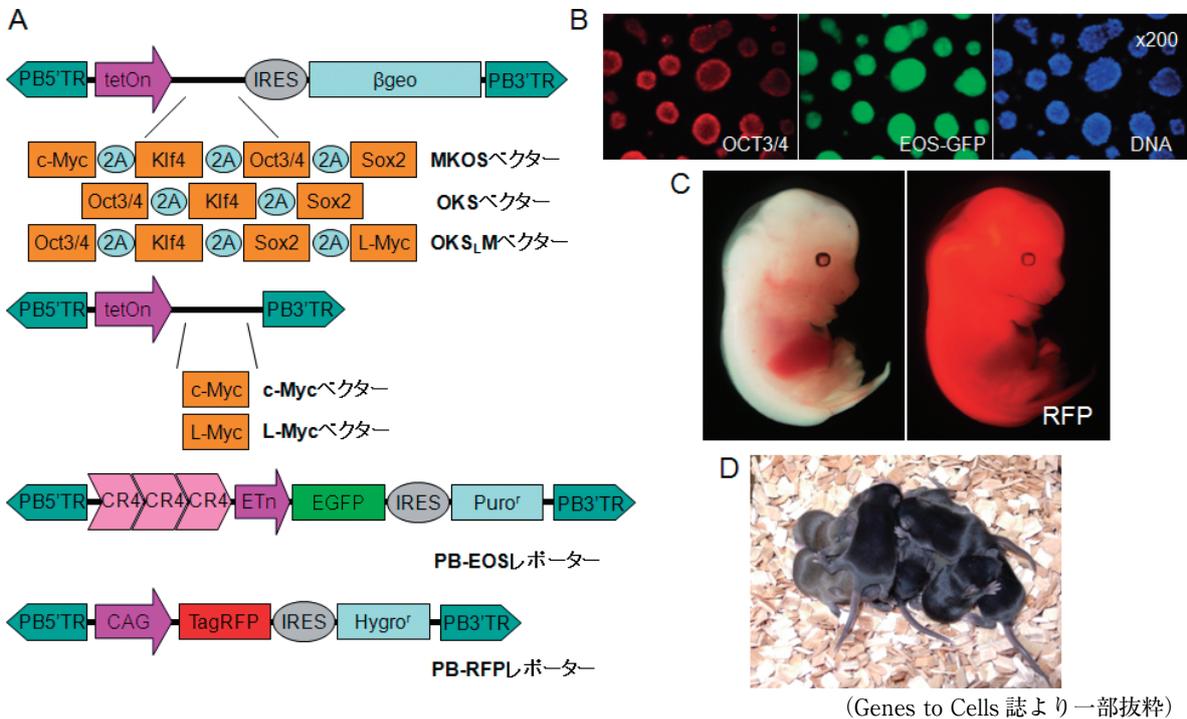


図2 EOS レポーターを使用したマウス iPS 細胞の樹立

A: 使用した PB ベクターの模式図。MKOS, OKS, OKS_LM ベクターは、Dox 誘導プロモーター発現制御下において 2A ペプチドで接続されたリプログラミング因子および βgeo を発現する。c-Myc, L-Myc ベクターは、Dox 誘導プロモーター発現制御下においてそれぞれ c-Myc, L-Myc を発現する。PB-EOS レポーターは、多能性細胞特異的に EGFP および Puromycin 耐性遺伝子を発現する。PB-RFP レポーターは、CAG プロモーター発現制御下において恒常的に TagRFP および Hygromycin 耐性遺伝子を発現する。TR: ターミナルリピート配列, tetOn: Dox 誘導プロモーター, 2A: 2A ペプチド, CR4: Oct3/4 のエンハンサー領域に存在する保存領域の一つ, ETn: Early Transposon プロモーター, Puro^r: Puromycin 耐性遺伝子, CAG: CAG プロモーター, Hygro^r: Hygromycin 耐性遺伝子 B: 樹立したマウス iPS 細胞。OCT3/4 および EOS-GFP を発現している。C: 樹立したマウス iPS 細胞のキメラマウスへの寄与。RFP 蛍光により全身に高度に寄与していることが分かる。D: 樹立したマウス iPS 細胞を用いて作製したキメラマウスの子孫。黒色の産仔が得られたことから、樹立したマウス iPS 細胞は生殖細胞に分化できることが示された。

テクニカルノート

の系を利用して、品質の高い iPS 細胞を得るための培養条件の評価が可能であると考えられる。

我々は現在、前述の実験系を用い、様々な動物種において iPS 細胞樹立を試みており、ブタ、イヌ、ウサギ、ウシなどの複数の動物種において、確かに EOS レポーター陽性の細胞が出現することを確認している。このことから、本実験系は、外来因子に依存することなく多能性を維持できる真の iPS 細胞樹立のための、ユニバーサルな培養条件の評価系として広く普及することが期待される。また、今後この系に、ケミカルスクリーニングなどの大規模なスクリーニング手法を応用することで、多能性基底状態にある真の多能性幹細胞株を樹立することが困難な動物種においても多能性幹細胞を樹立できる培養条件の同定が期待される。

- 1) Hanna, J.H., Saha, K., & Jaenisch, R. (2010) *Cell*, **143**, 508–525.
- 2) Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., & Jaenisch, R. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9222–9227.
- 3) Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., & McKay, R.D. (2007) *Nature*, **448**, 196–199.
- 4) Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., & Vallier, L. (2007) *Nature*, **448**, 191–195.
- 5) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007) *Cell*, **131**, 861–872.
- 6) Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007) *Nature*, **448**, 313–317.
- 7) Hotta, A., Cheung, A.Y., Farra, N., Vijayaragavan, K., Seguin, C.A., Draper, J.S., Pasceri, P., Maksakova, I.A., Mager, D.L., Rossant, J., Bhatia, M., & Ellis, J. (2009) *Nat. Methods*, **6**, 370–376.
- 8) Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., & Woltjen, K. (2009) *Nature*, **458**, 771–775.
- 9) Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H.K., & Nagy, A. (2009) *Nature*, **458**, 766–770.
- 10) Tsukiyama, T., Asano, R., Kawaguchi, T., Kim, N., Yamada, M., Minami, N., Ohinata, Y., & Imai, H. (2011) *Genes Cells*, **16**, 815–825.
- 11) Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14152–14157.