

平成 27 年度 研究経過報告書

研究者名

谷 哲弥

研究課題名

効率的転写活性化技術を利用した鳥類と魚類からの iPS 細胞樹立の試み

研究目的・内容

安定的かつ機能的な鳥類と魚類からの人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立は、生殖工学を駆逐することで農学分野への応用が期待されるが未だ安定かつ機能的な樹立には成功していない。本研究では、マウス及びヒトの iPS 細胞の樹立効率を劇的に高めることができるキメラ転写因子 (MyoD-TAD 融合 OCT4) を用いた転写活性化法により、両類の iPS 細胞が樹立できるか試みた。

研究の経過

iPS 細胞への誘導過程では、培養細胞にリプログラミング因子を導入することで細胞内の核ゲノムがリプログラミングし、細胞形態が単一細胞から細胞塊 (コロニー) を形成と幹細胞のマーカー遺伝子の発現や酵素活性などを示すようになる。また、遺伝子導入後に様々な培養条件により分化程度の異なる幹細胞への変化することや効率が向上することも哺乳動物の先行研究から明らかとなっている。そこで本研究では、魚類と鳥類の iPS 細胞樹立の基盤技術である培養細胞への遺伝子導入法と誘導培養法について検討した。

1. 魚類培養細胞への遺伝子導入法の検討

魚類の培養細胞への効率的な遺伝子導入法を検討するため、金魚由来鱗細胞株 GAKS 細胞 (理研バイオリソース) を用いてリポフェクション法、エレクトロポレーション法、レンチウイルスベクター法により GFP の発現を指標に導入効率を比較した結果、魚類培養細胞への遺伝子導入法はレンチウイルスベクター法が最適であった。

2. 鳥類培養細胞への遺伝子導入法の検討

鳥類の培養細胞は、奈良県特産品である大和肉鶏の有精卵 10 日目胚から胎児線維芽細胞を樹立した。この繊維芽細胞に 1.と同様な方法で遺伝子導入を行った結果、鳥類培養細胞への遺伝子導入法はエレクトロポレーション法とレンチウイルスベクター法が最適であった。

3. 魚類 iPS 細胞への誘導培養法の検討

リプログラミング因子を遺伝子導入した培養細胞は、マウス胎児線維芽細胞のフィーダー細胞上で①—④の培地①マウス iPS 培地、②ヒト iPS 細胞誘導培地、③Wnt 阻害剤を加えた領域選択制幹細胞誘導培地、④様々な小分子化合物含有誘導培地で 3 週間 iPS 細胞へ誘導を行い、細胞形態変化とアルカリフォスファターゼ酵素活性を調べた。その結果、すべての培養条件でも細胞形態の変化及び酵素活性陽性細胞の出現が見られず、iPS 細胞への誘導はできなかった。

4. 鳥類 iPS 細胞への誘導培養法の検討

3 の①—④の培養条件で iPS 細胞への誘導を行った結果、転写活性化法と④の培養条件で

のみアルカリフォスファターゼ活性のある iPS 細胞様コロニー形成を確認した。さらに、遺伝子発現解析の結果、数種類の幹細胞マーカー遺伝子の発現を確認した。

以上の結果から、鳥類と魚類の iPS 細胞誘導の基盤技術を確立することができた。転写活性化法を用いて iPS 細胞の誘導を行った結果、魚類では誘導できなかったが鳥類では可能であった。このことから、転写活性化法による iPS 細胞誘導は恒温動物である哺乳類や鳥類では有効であるが変温動物である魚類では効果が見られない、もしくは魚類での iPS 細胞誘導培地が未熟である可能性が示唆された。

本研究と関連した今後の研究計画

魚類の iPS 細胞樹立のために、誘導培地の改良を行なう必要があるため魚類血清、魚類卵黄または魚類由来成長因子を用いるなど培養条件の至適化を行なう。転写活性化法が恒温動物に有効であることが推測できるため、唯一の恒温魚類であるアカマンボウ由来細胞や一定の体温を保つことができるマグロの筋肉細胞など細胞種の検討を行いたい。

本年度得られた鳥類の iPS 細胞は、長期未分化を維持できる iPS 細胞の培養条件の探索やニワトリ有精卵に移植することで生殖巣キメラ動物を作製し、次世代へ iPS 細胞の特性が伝搬するか機能的特性を検討したい。

(平成 28 年 3 月 31 日現在)