

野生動物における iPS 細胞の樹立および生殖細胞の体外作製

清水 弘大¹, 黒坂 哲²

要旨

現在、地球上では多くの野生動物種が絶滅の危機に瀕しており、生物多様性の維持に向けた取り組みが求められている。動物園・水族館などの飼育下で動物を繁殖させる取り組みは「域外保全事業」と呼ばれ、人工繁殖技術はその中心となる技術である。本稿では、多能性幹細胞から生殖細胞を作製することが域外保全の発展に貢献する可能性があると考え、iPS 細胞の樹立および生殖細胞の体外作製について、先行研究を体系的にまとめることにより、遺伝的多様性の低下・人工繁殖の難航化・生殖細胞の回収が困難であることへの解決策を提案することを目的とする。

キーワード：野生動物、iPS 細胞、生殖細胞作製、域外保全事業

1. はじめに

現在、「絶滅危惧種レッドリスト (<https://www.iucnredlist.org>)」でも確認できるように、地球上に生息している非常に多くの野生動物が絶滅の危機に瀕しており、日々、レッドリストは更新され続けている。生物多様性という観点からは、ある野生動物種の絶滅は他の野生動物種の絶滅を、延いては地球全体の環境問題を引き起こす可能性もあり、たとえ小さな生態系内での出来事であっても看過できる問題ではない。本稿では、動物園・水族館などの飼育下で動物を繁殖させる「域外保全事業」を発展させることが本問題の解決の一助になると考え、その「域外保全事業」における諸問題について、多能性幹細胞から生殖細胞を作製することについて体系的にまとめることで諸問題への解決法を提案することを目的とする（図1）。

多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ES 細胞）^(1,2)または人工多能性幹細胞（iPS 細胞）⁽³⁾が代表的であるが、ES 細胞は胚盤胞期胚の内部細胞塊から樹立される多能性幹細胞であるため、将来、個体になる可能性のある胚を壊すことになる。マウス以外の動物種では ES 細胞の樹立は容易ではないため、貴重な野生動物種の胚を壊して ES 細胞を樹立することは現実的ではない。一方で、iPS 細胞は体細胞さえあればどの国・どの環境でも樹立できるため汎用性が高いと考え、今回は iPS 細胞に注目する。ここで、野生動物種においては導入したリプログラミング因子の遺伝子がゲノム上に残るのを避けなければならないため、iPS 細胞樹立の際にはレトロウイルス⁽³⁾やレンチウイルス⁽⁴⁾ではなく、ゲノムへの挿入が起こらないエピソーマルベクター⁽⁵⁾や導入遺伝子を除去するシステムがある PiggyBac⁽⁶⁾などを使用して樹立することが望まれる。また、多能性幹細胞には2つの型があり、マウス ES/iPS 細胞様の性質を示す多能性幹細胞をプライム型、マウスエピブラスト幹細胞様の性質を示す多能性幹細胞をナイーブ型と呼ぶ⁽⁷⁾。プライム型はナイーブ型よりも少し分化が進んだ状態であり、ナイーブ型の方が分化能は高く、生殖細胞に分化できる可能性が高いのはナイーブ型であるため、樹立した iPS

原稿受付 2023年1月8日

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

細胞はナイーブ型であることが望ましい。しかし、樹立されたマウス以外の動物種の iPS 細胞はほとんどがプライム型であり、こうしたプライム型の多能性幹細胞をナイーブ型へと変化させる技術も必要になる。

以降では、動物種における iPS 細胞樹立に関する現状と諸問題、解決策を紹介する。

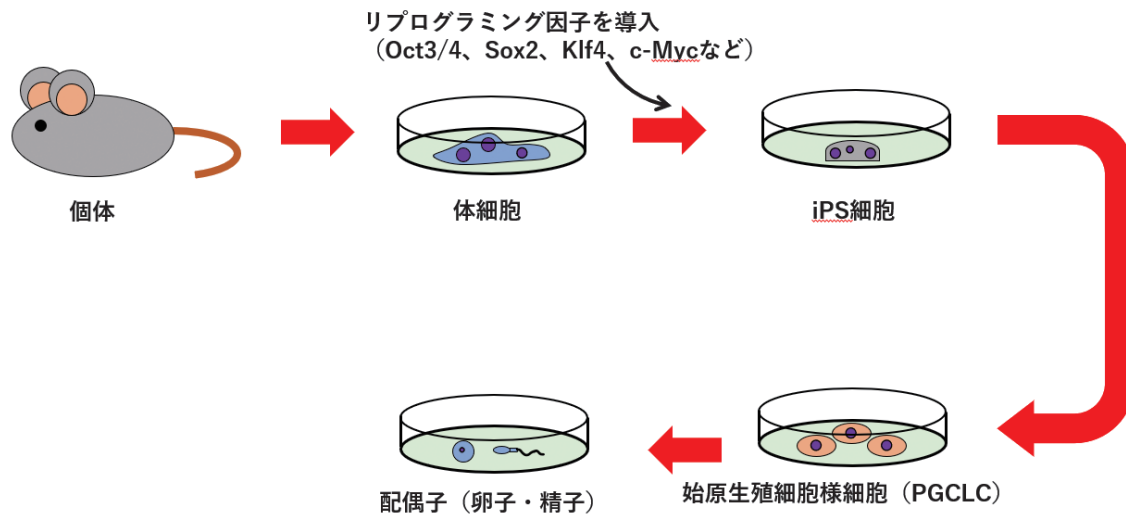


図1 体細胞からの配偶子形成

2. 各動物種における iPS 細胞樹立の現状

現在までに、分化誘導操作を含め iPS 細胞の樹立が報告されている動物種を文献情報データベースの「PubMed」で調べ分類すると、哺乳類では齧歯目^(3, 8-13)、霊長目^(14-25, 38)、偶蹄目^(26-33, 38)、奇蹄目^(19, 34-36)、食肉目⁽³⁷⁻⁴⁴⁾、兔形目⁽⁴⁵⁾、翼手目⁽⁴⁶⁾、フクロネコ形目⁽⁴⁷⁾、単孔目⁽⁴⁸⁾と多岐にわたり、鳥類ではウズラ、ニワトリ、ヤンバルクイナ、ライチョウ、シマフクロウ、イヌワシ、アヒル⁽⁴⁹⁻⁵²⁾の7種類、魚類ではゼブラフィッシュ⁽⁵³⁾とコイ⁽⁵⁴⁾の2種類が確認できる。爬虫類と両生類では確認できなかった(表1)。

これらの動物を「絶滅危惧種レッドリスト」をもとに絶滅危惧種・野生絶滅に限定して分類すると、i) 準絶滅危惧種にはカモノハシ、ジャガー、シロサイ、ii) 絶滅危惧 I 類にはユキヒョウ、iii) 絶滅危惧 IB 類にはアナウサギ、ミナミブタオザル、カニクイザル、ドリル、ベンガルトラ、チンパンジー、ボノボ、トビイロホオヒゲコウモリ、アマミトゲネズミ、タスマニアデビル、ヤンバルクイナ、シマフクロウ、iv) 絶滅危惧 IA 類にはニシゴリラ、オランウータン、v) 野生絶滅にはキタシロサイに分けることができる(表2)。

以上のことから、iPS 細胞は哺乳類・鳥類・魚類と多岐にわたる動物種において樹立することが可能であり、絶滅危惧種や野生絶滅した動物種に対しても十分に樹立可能であることが示唆されている。一方で、爬虫類や両生類、昆虫などでは研究が進んでおらず、本アプローチが有効でない可能性がある。

表1 iPS細胞樹立が報告された動物種一覧

綱	目	動物名 (参考論文番号)	綱	目	動物名 (参考論文番号)
哺乳綱	齧歯目	マウス (3)	哺乳綱	奇蹄目	ウマ (34)
		ラット (8)			キタシロサイ (19, 35)
		プレーリーハタネズミ (9)		ミナミシロサイ (35)	
ルーマニアハタネズミ (10)	グレビーシマウマ (36)				
ユーラシアハタネズミ (10)	食肉目	イヌ (37)			
ハダカデバネズミ (11)		ービーグル犬 (38)			
アマミトゲネズミ (12)		ユキヒョウ (39)			
チャイニーズハムスター (13)		ベンガルトラ (40)			
ヒト (14)		サーバル (40)			
霊長目	アカゲザル (15)	ジャガー (40)	兎形目	アナウサギ (45)	
	コモンマーモセット (16, 38)	アメリカミンク (41)	翼手目	トビイロホオヒゲコウモリ (46)	
	ミナミブタオザル (17)	イエネコ (42)	フクロネコ形目	タスマニアデビル (47)	
	カニクイザル (18)	フェレット (43)	単孔目	カモノハシ (48)	
	ドリル (19)	ワモンアザラシ (44)	鳥綱	キジ目	ウズラ (49)
	チンパンジー (20)	ニワトリ (50, 52)			
	ボノボ (20)	ヤンバルクイナ (51)		ツル目	ライチョウ (51)
	アヌビスヒビ (21)	シマフクロウ (51)			
	ニシゴリラ (22)	タカ目		イヌワシ (51)	
	オランウータン (23)	カモ目	アヒル (52)		
ニホンザル (24)	硬骨魚綱	コイ目	ゼブラフィッシュ (53)		
ミドリザル (25)			コイ (54)		
偶蹄目	ブタ (26, 38)	ミニブタ			
	ーチベット地方 (27)、巴馬地方 (28)	ウシ (29)			
	ヒツジ (30)	ヤギ (31)			
	ーカシミヤヤギ (32)	スイギュウ (33)			

表2 iPS細胞樹立が報告された絶滅危惧種・野生絶滅動物

分類	動物名
準絶滅危惧種 (NT)	カモノハシ ジャガー
絶滅危惧I類 (VU)	ユキヒョウ
絶滅危惧IB類 (EN)	アナウサギ
	ミナミブタオザル
	カニクイザル
	ドリル
	ベンガルトラ
	チンパンジー
	ボノボ
	トビイロホオヒゲコウモリ
	アマミトゲネズミ
	タスマニアデビル
グレビーシマウマ	
ヤンバルクイナ	
シマフクロウ	
絶滅危惧IA類 (CR)	ニシゴリラ
	オランウータン
野生絶滅 (EW)	キタシロサイ

3. 各動物種における「導入遺伝子を残さない」iPS細胞樹立の現状

前項に示したように、iPS細胞の樹立報告は多くの動物種で行われているが、野生動物種においては導入したリプログラミング因子がゲノム上に残るのを避けなければならない。そこで、遺伝子導入を必要としないエピソーマルベクター（プラスミド）や非統合型センダイウイルスベクター、導入遺伝子を後から除去できる PiggyBac（トランスポゾン）、小分子化合物のみを使用した iPS 細胞樹立方法（図2）の研究が行われている。野生動物種において、エピソーマルベクターを使用した iPS 細胞樹立はニホンザル⁽²⁴⁾、ラット⁽⁵⁶⁾、ブタ⁽³⁸⁾、イヌ（ビーグル犬）⁽³⁸⁾、コモンマーモセット⁽³⁸⁾、フェレット⁽⁴³⁾、アカゲザル⁽⁵⁵⁾、アヌビスヒビ⁽⁵⁵⁾、チンパンジー⁽⁵⁷⁾、キタシロサイ⁽⁵⁸⁾、カニクイザル⁽⁵⁹⁾で行われており、リプログラミング因子の除去が確認されている。ただし、キタシロサイにおいては PiggyBac によって導入された抗アポトーシス遺伝子 BCL2 が、ナイーブ型 iPS 細胞の未分化維持に不可欠であることが示唆されており、配偶子形成には適さないことが指摘されている⁽⁵⁸⁾。非統合型センダイウイルスベクターを使用した iPS 細胞樹立はカニクイザル⁽⁶⁰⁾とキタシロサイ⁽⁶¹⁾で行われており、リプログラミング因子の除去が確認されている。PiggyBac を使用した iPS 細胞樹立はアマミトゲネズミ⁽¹²⁾、ウマ⁽³⁴⁾、トビイロホオヒゲコウモリ⁽⁴⁶⁾、ヤンバルクイナ⁽⁵¹⁾、ライチョウ⁽⁵¹⁾、シマフクロウ⁽⁵¹⁾、イヌワシ⁽⁵¹⁾、ウシ⁽⁶²⁾、ヒツジ⁽⁶³⁾、プレーリーハタネズミ⁽⁶⁴⁾で行われている。しかし、ウマ、ウシ、ヒツジではドキシサイクリン（Dox）誘導性による異所的発現（図3）でリプログラミングを行っており、Dox 非存在下では分化または細胞死となる。トビイロホオヒゲコウモリ、ヤンバルクイナ、ライチョウ、シマフクロウ、イヌワシ、プレーリーハタネズミでは挿入された遺伝子の除去後の経過が不明、または iPS 細胞維持のために挿入された外因性遺伝子を使用しているため、完全な「導入遺伝子を残さない」iPS 細胞とは呼べない。アマミトゲネズミでは Dox 誘導性による異所的発現を利用してリプログラミングを行った後、培地を CHIR99021（GSK3β 阻害剤）、PD0325901（FGF-MAPK 阻害剤）、SB590885（B-Raf 阻害剤）を添加した N2B27 培地に変更することで分化を防ぎ、Dox 非存在下でナイーブ型 iPS 細胞の維持に成功している。CHIR99021 や PD0325901、616452（TGF-β 阻害剤）などの小分子化合物のみを使用した iPS 細胞樹立はマウス、コイで行われており、特にマウスの場合は iPS 細胞樹立効率が Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc をリプログラミング因子に使用した場合に匹敵する効率にまで改善されている^(54, 65)。

以上のことから、現在の研究状況からはエピソーマルベクターを使用した方法が遺伝子導入なしの iPS 細胞樹立に適していることが示唆されており、確実に導入遺伝子が存在しない小分子化合物のみの方は今後の発展に期待できる。

4. iPS細胞樹立における各動物種の特徴

野生動物種においては、単に山中因子（Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc）を用いてリプログラミングを誘導するだけで iPS 細胞が樹立できるわけではなく、一部の動物種では、その動物種に適した導入遺伝子や培養方法を必要とすることが示唆されている。

導入遺伝子では、i) 偶蹄目のウシ、ヒツジ、ヤギ、ii) ネコ科のユキヒョウ、ベンガルトラ、サーバル、ジャガー、iii) 鳥類のアヒルの実験ではリプログラミング因子に Nanog を加えることがこれらの動物種の iPS 細胞を安定して樹立するのに必要不可欠であることが示唆されている^(29, 30, 31, 39, 40, 52)。特に、ヒツジとヤギでは SV40 large T や hTERT も iPS 細胞の安定した樹立に必要であることが示唆されている^(30, 31)。アマミトゲネズミやニワトリでは、リプログラミング因子に Nanog を追加することで

iPS 細胞の樹立効率が上昇している^(12, 52)。また、トビイロホオヒゲコウモリではリプログラミング因子に Nr5a2、miR302/367 が使用されている他⁽⁴⁶⁾、タスマニアデビル、カモノハシ、鳥類ではウズラ、ヤンバルクイナ、ライチョウ、シマフクロウ、イヌワシでもリプログラミング因子に Nanog が加えられており、比較対象がないため断定はできないが、これらのリプログラミング因子が必須である可能性が残されている^(47-49, 51)。一方で、アメリカミンクでは iPS 細胞における Nanog の発現が低い特徴が見られ、アメリカミンクにおいては多能性に Nanog が関与していない可能性が示唆された⁽⁴¹⁾。鳥類ではヤンバルクイナ、ライチョウ、シマフクロウと同じリプログラミング因子ではイヌワシの iPS 細胞樹立に失敗したため、Oct3/4 の発現量を増加させ、Yap 遺伝子を追加することで樹立に成功し、Yap/Taz 経路が鳥類における幹細胞の質を改善できる可能性が示唆された⁽⁵¹⁾。ハダカデバネズミでは、低酸素条件または c-Myc なしでは iPS 細胞を樹立できず、alternative reading frame(ARF)を抑制することで細胞の老化が誘導される ARF suppression induced senescence(ASIS)と名付けられた現象も確認された⁽¹¹⁾。

培養に使用する血清では、ルーマニアハタネズミとユーラシアハタネズミの雑種個体における皮膚線維芽細胞のリプログラミングで、血清に 15%KSR (KnockOut Serum Replcement : ノックアウト血清代替品) を使用しても iPS 細胞は樹立できなかったが、7%KSR と 7%FBS (Fetal Bovine Serum : ウシ胎児血清) の組み合わせに変更したところ樹立に成功した。FBS の濃度を 7%未満にすると iPS 細胞が分化してしまうことも判明し、近縁種のプレーリーハタネズミと比較して、雑種個体の iPS 細胞樹立がより困難である可能性が示唆された⁽¹⁰⁾。また、魚類や鳥類では KSR、FBS の他に近縁種のコイ血清やニワトリ血清を使用して iPS 細胞を樹立しており、比較対象が少ないため断定はできないが KSR、FBS だけでは iPS 細胞を樹立できない可能性がある⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾。

以上のことから、それぞれの種ごとに求められる条件が異なり、野生動物種の iPS 細胞樹立方法を統一することは困難であるから、新たな野生動物種の iPS 細胞を樹立する際には近縁種の先行研究を参考にするのが現実的な解決法である。また、導入遺伝子を追加することも iPS 細胞樹立の改善につながる可能性が示唆されている。

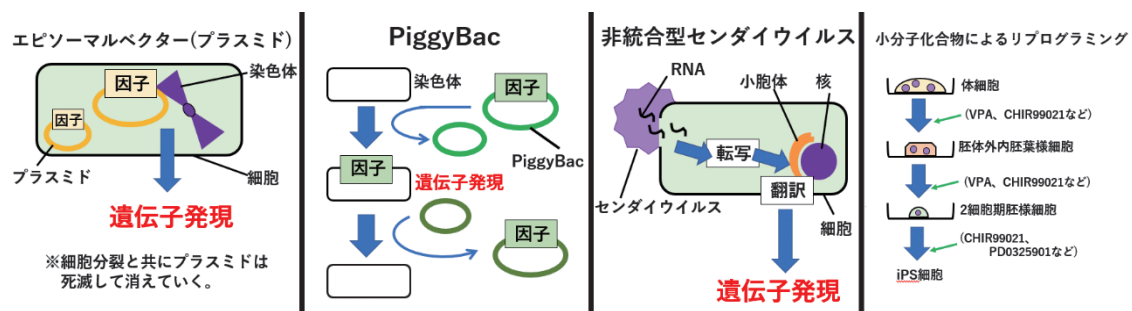


図2 導入遺伝子を残さない遺伝子発現システム

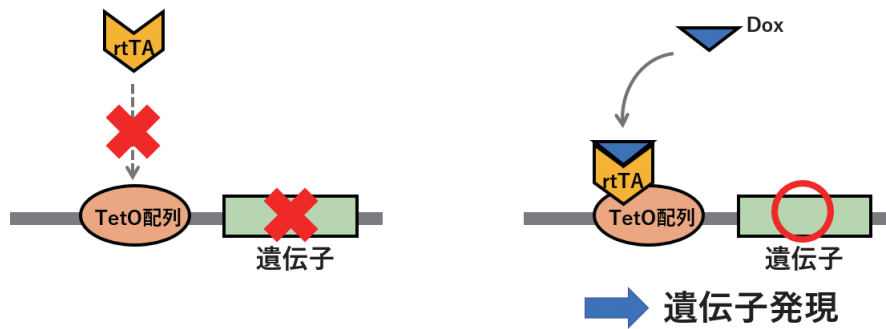


図3 ドキシサイクリン (Dox) 誘導による遺伝子発現システム

5. ナイーブ型 iPS 細胞への変換

野生動物種においてはアマミトゲネズミ⁽¹²⁾、コモンマーモセット⁽³⁸⁾、キタシロサイ⁽⁵⁸⁾、カニクイザル⁽⁵⁹⁾、ウシ⁽⁶²⁾、アカゲザル⁽⁶⁶⁾でナイーブ型 iPS 細胞の樹立が行われている。

アカゲザルでは 2i/LIF (2i= CHIR99021 と PD0325901, LIF=白血球抑制因子) の培養条件に bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) を加えることでナイーブ型への変換に成功している他、さらに SP600125 (JNK 阻害剤) と SB203580 (p38 阻害剤) を加えて Oct3/4、Sox2、Klf4 を過剰発現させることで、線維芽細胞においてプライム型を介さずに直接ナイーブ型の iPS 細胞を樹立することにも成功している⁽⁶⁶⁾。しかし、Gafni らの報告⁽⁶⁷⁾においてヒトのナイーブ型 ES 細胞/iPS 細胞の生存・維持に有効であった Y-27632 (ROCK 阻害剤) と Go6983 (PKC 阻害剤) が、アカゲザルにおいては分化を促進しており⁽⁶⁶⁾、動物種によって薬剤の効果が異なる可能性は考慮すべきであろう。

コモンマーモセットでは、先行研究から Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Klf2、Nanog の過剰発現でヒト iPS 細胞とコモンマーモセット ES 細胞をナイーブ型に変換できることが実証されていたもの^(68, 69)、この 6 因子だけでは iPS 細胞が樹立できず、GLIS1 と KDM4D を加えた 8 因子でリプログラミングを行うことで iPS 細胞の樹立に成功している⁽³⁸⁾。

ウシ iPS 細胞においては、2010 年に報告されたヒト⁽⁷⁰⁾と同様に、培地に 2i とフォルスコリンを追加することでナイーブ型への変換に成功した。また、ウシでは LIF と CHIR99021 のみでナイーブ型 iPS 細胞の維持が可能であった⁽⁶²⁾。

アマミトゲネズミでは Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の組み合わせに Nanog の異所的発現による過剰発現を行うことでナイーブ型 iPS 細胞の樹立に成功した。また、N2B27 培地に CHIR99021、PD0325901、LIF を加えたマウス ES 細胞を未分化維持できる培地⁽⁷¹⁾でナイーブ型 iPS 細胞の未分化維持を試みたが失敗し、ヒトナイーブ型 ES 細胞の樹立に有効な SB590885⁽⁷²⁾を加えることで維持に成功した⁽¹²⁾。

カニクイザルではウサギ ES 細胞/iPS 細胞をナイーブ型に変換するための Oct3/4 の過剰発現を伴う KSR、CHIR99021、フォルスコリン、ケンパウロンを使用した培養方法^(72, 73)を使用したものの未分化維持できなかったため、Dox 誘導による Klf2、Nanog の異所的過剰発現を行い、SB590885 と Go6983 を加えることでナイーブ型 iPS 細胞の樹立に成功した⁽⁷¹⁾。

キタシロサイでは、Gafni らの方法⁽⁶⁷⁾をベースにした RSeT 培地を使用した方法と、Wang らの方法⁽⁷⁴⁾を変更した N2B27 培地を使用した方法でナイーブ型への変換を試みたところ細胞死を示す結果となったが、ヒトとマウス ES 細胞の生存率を上昇させる BCL2⁽⁷⁵⁾を Dox 誘導性の形で PiggyBac を用いて導入し、発現させることでナイーブ型への変換に成功した。ただし、ナイーブ型の未分化維持には

BCL2 の発現が不可欠であり、この方法で樹立されるナイーブ型 iPS 細胞は生殖細胞の作製には適用できないことが指摘されている⁽⁵⁸⁾。

以上のことから、「導入遺伝子を残さない」ナイーブ型 iPS 細胞を樹立することが望まれるため、アカゲザル、ウシ、アマミトゲネズミで使用されているような導入遺伝子に頼らない培養液のみでナイーブ型へ変換・維持できる培養方法が野生動物種におけるナイーブ型 iPS 細胞の樹立には適している。

6. 生殖細胞への分化誘導

多能性幹細胞から生殖細胞を作製する試みにおいて、PGCLC への分化・誘導はコモンマーモセット⁽³⁸⁾、マウス⁽⁷⁶⁾、ヒト⁽⁷⁷⁾、ブタ⁽⁷⁸⁾、ウサギ⁽⁷⁹⁾、カニクイザル⁽⁸⁰⁾、ミナミシロサイ⁽⁶¹⁾、キタシロサイ⁽⁶¹⁾で行われており、配偶子作製はマウス^(81, 82)でのみ成功している。ここでは、主に iPS 細胞を使用したものに注目する。

PGCLC への誘導において、マウスとヒト以外の動物種に注目すると、ブタでは EPS 細胞 (Expanded Potential Stem Cells) を GMEM と 15%KSR の基礎培地に BMP4、LIF、SCF (Stem Cell Factor) を加えて培養することで PGCLC の誘導に成功した⁽⁷⁸⁾。コモンマーモセットではブタと同様の培養方法では PGCLC を誘導できず、BMP4、LIF、SCF、EGF に変更し、デキサメタゾン/ドキシサイクリン誘導性 Sox17/Blimp1 過剰発現システムと組み合わせることでナイーブ型 iPS 細胞からの PGCLC 誘導に成功した⁽³⁸⁾。カニクイザルでは GMEM と 15%KSR の基礎培地よりも、Advanced RPMI 1640 と B27 を基礎培地とした方の効率が良く、BMP4、LIF、SCF、EGF、Y-27632 を加えて培養を行い、ナイーブ型 iPS 細胞から PGCLC の誘導に成功した⁽⁸⁰⁾。ミナミシロサイではプライム型 ES 細胞を Advanced RPMI 1640 と 10%KSR を基礎培地とし、BMP4、LIF、SCF、EGF、Y-27632、CHIR99021、IWR1 (WNT 阻害剤)、bpV (PTEN 阻害剤)、フォルスコリンを加えた培地で PGCLC の誘導に成功し、同様の方法でキタシロサイのプライム型 iPS 細胞からも PGCLC の誘導に成功した。誘導された PGCLC の数がはるかに少なかったものの、BMP4 を除去することで誘導効率は上昇した⁽⁶¹⁾。多能性幹細胞からの配偶子作製はマウスでのみ成功しており、雌性配偶子⁽⁸¹⁾、雄性配偶子⁽⁸²⁾の両方の誘導に成功している。

以上のことから、ナイーブ型 iPS 細胞からの PGCLC 誘導は培養のみで行うことができ、培養方法は動物種によっても大きくは変わらない。また、プライム型 iPS 細胞からの PGCLC 誘導も報告されており、プライム型からナイーブ型への変換を省略できる可能性も示唆されている。一方、配偶子作製に成功しているのは現時点ではマウスのみであり、今後は他の動物種での研究の進展が期待される。

7. おわりに

多くの動物種において体細胞から iPS 細胞を作製し、*in vitro* 下で iPS 細胞から配偶子を作成することができれば、動物から生殖細胞を回収する必要がなくなる。さらに、自然交配では雄の状態や雌雄の個体同士の相性に左右されるところが大きいのが、配偶子を体外で作製できれば、妊娠可能な雌個体さえいれば個体生産が可能となり、近縁種を代理母とした胚移植による個体生産も可能になるかもしれない。また、こうした細胞を凍結・運搬することで世界中の動物園・水族館にいる生物で子孫を残すことが可能となるため、遺伝的多様性の低下も防ぐことが出来る。一方で、*in vitro* 下での配偶子形成はマウスでのみ成功しており、未だ発展途上にある。しかし、マウスで配偶子作製が成功している事実から、これからより多くの動物種で研究を行い、データを収集することで、マウス以外の動物種

でも多能性幹細胞から配偶子を作製し、繁殖させることは現実的に可能であると考えられる。この技術が発展すれば、近い将来、絶滅の危機に瀕している野生動物種の個体数回復への一助となる実証研究が進むと考えられる。

8. 参考文献

- (1) Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- (2) Martin, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7634-7638.
- (3) Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- (4) Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., *et al.* (2007) Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 1, 245-247.
- (5) Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., *et al.* (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797-801.
- (6) Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., *et al.* (2009) Piggybac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- (7) Nichols, J. and Smith, A. (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4, 487-492.
- (8) Liao, J., Cui, C., Chen, S., *et al.* (2009) Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 4, 11-15.
- (9) Manoli, D. S., Subramanyam, D., Carey, C., *et al.* (2012) Generation of induced pluripotent stem cells from the prairie vole. *PLoS One* 7, e38119.
- (10) Grigor'eva, E. V., Shevchenko, A. I., Medvedev, SP., *et al.* (2015) Induced pluripotent stem cells of *microtus levis* x *microtus arvalis* vole hybrids: conditions necessary for their generation and self-renewal. *Acta Naturae* 7, 56-69.
- (11) Miyawaki, S., Kawamura, Y., Oiwa, Y., *et al.* (2016) Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats. *Nature Communication* 7, 11471.
- (12) Honda, A., Chojookhuu, N., Izu, H., *et al.* (2017) Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered *Tokudaia osimensis*. *Science Advances* 3, e1602179.
- (13) Pei, H., Fu, H. Y., Hirai, H., *et al.* (2017) Generation of induced pluripotent stem cells from Chinese hamster embryonic fibroblasts. *Stem Cell Research* 21, 132-136.
- (14) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., *et al.* (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- (15) Liu, H., Zhu, F., Yong, J., *et al.* (2008) Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3, 587-590.
- (16) Wu, Y., Zhang, Y., Mishra, A., *et al.* (2010) Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts. *Stem Cell Research* 4, 180-188.

-
- (17) Zhong, B., Trobridge, G. D., Zhang, X., *et al.* (2011) Efficient generation of nonhuman primate induced pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development* 20, 795-807.
 - (18) Okamoto, S. and Takahashi, M. (2011) Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52, 8785-8790.
 - (19) Ben-Nun, I. F., Montague, S. C., Houck, M. L., *et al.* (2011) Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature Methods* 8, 829-831.
 - (20) Marchetto, M. C. N., Narvaiza, I., Denli, A. M., *et al.* (2013) Differential L1 regulation in pluripotent stem cells of humans and apes. *Nature* 503, 525-529.
 - (21) Navara, C. S., Hornecker, J., Grow, D., *et al.* (2013) Derivation of induced pluripotent stem cells from the baboon: a nonhuman primate model for preclinical testing of stem cell therapies. *Cellular Reprogramming* 15, 495-502.
 - (22) Wunderlich, S., Kircher, M., Vieth, B., *et al.* (2014) Primate iPS cells as tools for evolutionary analyses. *Stem Cell Research* 12, 622-629.
 - (23) Ramaswamy, K., Yik, W. Y., Wang, X. M., *et al.* (2015) Derivation of induced pluripotent stem cells from orangutan skin fibroblasts. *BMC Research Notes* 8, 577.
 - (24) Nakai, R., Ohnuki, M., Kuroki, K., *et al.* (2018) Derivation of induced pluripotent stem cells in Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *Scientific Reports* 8, 12187.
 - (25) Chung, Y. G., Seay, M., Elsworth, J. D., *et al.* (2020) Generation of pluripotent stem cells using somatic cell nuclear transfer and induced pluripotent somatic cells from african green monkeys. *Stem Cells and Development* 29, 1294-1307.
 - (26) Wu, Z., Chen, J., Ren, J., *et al.* (2009) Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *Journal Molecular Cell Biology* 1, 46-54.
 - (27) Esteban, M. A., Xu, J., Yang, J., *et al.* (2009) Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *Journal Biological Chemistry* 284, 17634-17640.
 - (28) Li, X., Shan, Z. Y., Wu, Y. S., *et al.* (2014) Generation of neural progenitors from induced Bama miniature pig pluripotent cells. *Reproduction* 147, 65-72.
 - (29) Sumer, H., Liu, J., Malaver-Ortega, L. F., *et al.* (2011) NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *Journal of Animal Science* 89, 2708-2716.
 - (30) Bao, L., He, L., Chen, J., *et al.* (2011) Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Research* 21, 600-608.
 - (31) Ren, J., Pak, Y., He, L., *et al.* (2011) Generation of hircine-induced pluripotent stem cells by somatic cell reprogramming. *Cell Research* 21, 849-853.
 - (32) Tai, D., Liu, P., Gao, J., *et al.* (2015) Generation of arbas cashmere goat induced pluripotent stem cells through fibroblast reprogramming. *Cellular Reprogramming* 17, 297-305.
 - (33) Deng, Y., Liu, Q., Luo, C., *et al.* (2012) Generation of induced pluripotent stem cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal fibroblasts with buffalo defined factors. *Stem Cells and Development* 21, 2485-2494.
 - (34) Nagy, K., Sung, H. K., Zhang, P., *et al.* (2011) Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Reviews and Reports* 7, 693-702.

- (35) Korody, M. L., Ford, S. M., Nguyen, T. D., *et al.* (2021) Rewinding extinction in the northern white rhinoceros: genetically diverse induced pluripotent stem cell bank for genetic rescue. *Stem Cells and Development* 30, 177-189.
- (36) Endo, Y., Kamei, K. I., Hasegawa, K., *et al.* (2022) Generation and gene expression profiles of grevy's zebra induced pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development* 31, 250-257.
- (37) Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., *et al.* (2010) Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Molecular Reproduction and Development* 77, 2.
- (38) Yoshimatsu, S., Nakajima, M., Iguchi, A., *et al.* (2021) Non-viral induction of transgene-free ipscs from somatic fibroblasts of multiple mammalian species. *Stem Cell Reports* 16, 754-770.
- (39) Verma, R., Holland, M. K., Temple-Smith, P., *et al.* (2012) Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology* 77, 220-228.
- (40) Verma, R., Liu, J., Holland, M. K., *et al.* (2013) Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. *BioResearch Open Access* 2, 72-76.
- (41) Menzorov, A. G., Matveeva, N. M., Markakis, M. N., *et al.* (2015) Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes. *BMC Genomics* 16 Suppl 13(Suppl 13), S6
- (42) Dutton, L. C., Dudhia, J., Guest, D. J., *et al.* (2019) Inducing pluripotency in the domestic cat (*Felis catus*). *Stem Cells and Development* 28, 1299-1309.
- (43) Gao, J., Petraki, S., Sun, X., *et al.* (2020) Derivation of induced pluripotent stem cells from ferret somatic cells. *American Journal Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 318, L671-L683.
- (44) Beklemisheva, V. R., Belokopytova, P. S., Fishman, V. S., *et al.* (2021) Derivation of ringed seal (*Phoca hispida*) induced multipotent stem cells. *Cellular Reprogramming* 23, 326-335.
- (45) Honda, A., Hirose, M., Hatori, M., *et al.* (2010) Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *Journal Biological Chemistry* 285, 31362-31369.
- (46) Mo, X., Li, N., Wu, S., *et al.* (2014) Generation and characterization of bat-induced pluripotent stem cells. *Theriogenology* 82, 283-293.
- (47) Weeratunga, P., Shahsavari, A., Ovchinnikov, D. A., *et al.* (2018) Induced pluripotent stem cells from a marsupial, the tasmanian devil (*Sarcophilus harrisi*): insight into the evolution of mammalian pluripotency. *Stem Cells and Development* 27, 112-122.
- (48) Whitworth, D. J., Limnios, I. J., Gauthier, M. E., *et al.* (2019) Platypus induced pluripotent stem cells: the unique pluripotency signature of a monotreme. *Stem Cells and Development* 28, 151-164.
- (49) Lu, Y., West, F. D., Jordan, B. J., *et al.* (2012) Avian-induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells and Development* 21, 394-403.
- (50) Dai, R., Rossello, R., Chen, C. C., *et al.* (2014) Maintenance and neuronal differentiation of chicken induced pluripotent stem-like cells. *Stem Cells International* 2014, 182737.
- (51) Katayama, M., Fukuda, T., Kaneko, T., *et al.* (2022) Induced pluripotent stem cells of endangered avian species. *Communications Biology* 5, 1049.

-
- (52) Fuet, A., Montillet, G., Jean, C., *et al.* (2018) Nanog is required for the long-term establishment of avian somatic reprogrammed cells. *Stem Cell Reports* 11, 1272-1286.
- (53) Peng, L., Zhou, Y., Xu, W., *et al.* (2019) Generation of stable induced pluripotent stem-like cells from adult zebra fish fibroblasts. *International Journal Biological Sciences* 15, 2340-2349.
- (54) Xu, W., Li, H., Peng, L., *et al.* (2021) Fish pluripotent stem-like cell line induced by small-molecule compounds from caudal fin and its developmental potentiality. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9, 817779.
- (55) Stauske, M., Polo, I. R., Haas, W., *et al.* (2020) Non-human primate ipsc generation, cultivation, and cardiac differentiation under chemically defined conditions. *Cells* 9, 1349.
- (56) Li, S., Lan, H., Men, H., *et al.* (2017) Derivation of transgene-free rat induced pluripotent stem cells approximating the quality of embryonic stem cells. *Stem Cells Translational Medicine* 6, 340-351.
- (57) Kitajima, R., Nakai, R., Imamura, T., *et al.* (2020) Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research* 44, 101749.
- (58) Zywitzka, V., Rusha, E., Shaposhnikov, D., *et al.* (2022) Naïve-like pluripotency to pave the way for saving the northern white rhinoceros from extinction. *Scientific Reports* 12, 3100.
- (59) Honda, A., Kawano, Y., Izu, H., *et al.* (2017) Discrimination of stem cell status after subjecting cynomolgus monkey pluripotent stem cells to naïve conversion. *Scientific Reports* 7, 45285.
- (60) Coppello, G., Abizanda, G., Aguado, N., *et al.* (2017) Generation of *Macaca fascicularis* iPS cell line ATCi-MF1 from adult skin fibroblasts using non-integrative Sendai viruses. *Stem Cell Research* 21, 1-4.
- (61) Hayashi, M., Zywitzka, V., Naitou, Y., *et al.* (2022) Robust induction of primordial germ cells of white rhinoceros on the brink of extinction. *Science Advances* 8, eabp9683.
- (62) Kawaguchi, T., Tsukiyama, T., Kimura, K., *et al.* (2015) Generation of naïve bovine induced pluripotent stem cells using piggybac transposition of doxycycline-inducible transcription factors. *PLoS One* 10, e0135403.
- (63) Liu, M., Zhao, L., Wang, Z., *et al.* (2021) Generation of sheep induced pluripotent stem cells with defined dox-inducible transcription factors via piggybac transposition. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9, 785055.
- (64) Katayama, M., Hirayama, T., Horie, K., *et al.* (2016) Induced pluripotent stem cells with six reprogramming factors from prairie vole, which is an animal model for social behaviors. *Cell Transplantation* 25, 783-796.
- (65) Zhao, T., Fu, Y., Zhu, J., *et al.* (2018) Single-cell rna-seq reveals dynamic early embryonic-like programs during chemical reprogramming. *Cell Stem Cell* 23, 31-45.
- (66) Fang, R., Liu, K., Zhao, Y., *et al.* (2014) Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 15, 488-497.
- (67) Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A. A., *et al.* (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504, 282-286.
- (68) Kisa, F., Shiozawa, S., Oda, K., *et al.* (2017) Naive-like esrrb⁺ ipscs with the capacity for rapid neural

- differentiation. *Stem Cell Reports* 9, 1825-1838.
- (69) Shiozawa, S., Nakajima, M., Okahara, J., *et al.* (2020) Primed to naive-like conversion of the common marmoset embryonic stem cells. *Stem Cells and Development* 29, 761-773.
- (70) Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., *et al.* (2010) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9222-9227.
- (71) Theunissen, T. W., Powell, B. E., Wang, H., *et al.* (2014) Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* 15, 471-487.
- (72) Honda, A., Hatori, M., Hirose, M., *et al.* (2013) Naive-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of induced pluripotent stem cells. *Journal of Biological Chemistry* 288, 26157-26166.
- (73) Honsho, K., Hirose, M., Hatori, M., *et al.* (2015) Naïve-like conversion enhances the difference in innate *in vitro* differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells. *Journal Reproduction and Development* 61, 13-19.
- (74) Wang, J., Singh, M., Sun, C., *et al.* (2016) Isolation and cultivation of naive-like human pluripotent stem cells based on HERVH expression. *Nature Protocols* 11, 327-346.
- (75) Ardehali, R., Inlay, M. A., Ali, S. R., *et al.* (2011) Overexpression of BCL2 enhances survival of human embryonic stem cells during stress and obviates the requirement for serum factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 3282-3287.
- (76) Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., *et al.* (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146, 519-532.
- (77) Sasaki, K., Yokobayashi, S., Nakamura, T., *et al.* (2015) Robust *in vitro* induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 17, 178-194.
- (78) Gao, X., Nowak-Imialek, M., Chen, X., *et al.* (2019) Establishment of porcine and human expanded potential stem cells. *Nature Cell Biology* 21, 687-699.
- (79) Kobayashi, T., Castillo-Venzor, A., Penfold, C. A., *et al.* (2021) Tracing the emergence of primordial germ cells from bilaminar disc rabbit embryos and pluripotent stem cells. *Cell Reports* 37, 109812.
- (80) Sakai, Y., Nakamura, T., Okamoto, I., *et al.* (2020) Induction of the germ cell fate from pluripotent stem cells in cynomolgus monkeys†. *Biology of Reproduction* 102, 620-638.
- (81) Hikabe, O., Hamazaki, N., Nagamatsu, G., *et al.* (2016) Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* 539, 299-303.
- (82) Ishikura, Y., Ohta, H., Sato, T., *et al.* (2021) *In vitro* reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 28, 2167-2179.

英文抄録

Establishment of iPS Cells and *in vitro* Production of Germ Cells in Wild Animal Species

Kodai Shimizu¹ and Satoshi Kurosaka²

Currently, many animal species on this planet are at risk of extinction, and the conservation of biodiversity is a pressing issue. The conservation program to maintain or recover the population of species outside their natural habitat by artificial reproduction at zoos, aquariums, etc, are called “*ex situ* conservation”. Establishment of pluripotent stem cells and *in vitro* production of germ cells have great potential to contribute to the successful *ex situ* conservation. Here, we introduce the history and current status of the establishment of iPS cells and *in vitro* production of germ cells in wild animal species, and discuss the future of *ex situ* conservation.

Keywords : wild animal species, iPS cells, germ cell production, *ex situ* conservation

1. Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Institute of Advanced Technology, Kindai University, Wakayama 624-0017, Japan