

鳥類を中心とした細胞運命制御と新規研究基盤細胞の開発

片山 雅史 (国立研究開発法人国立環境研究所 生物多様性領域)

katayama.masafumi@nies.go.jp

生体から取得した培養細胞は、医学・創薬研究を中心に活発に利用され、無限分裂細胞（不死化細胞）や iPS 細胞（人工多能性幹細胞）の樹立まで大きく発展している。一方で家禽を含めた鳥類では発展途上であり、研究が必要であった。そこで、本研究では鳥類などの iPS 細胞と無限分裂細胞の樹立法の開発、さらに体細胞の効率的な培養条件を明らかにした。本業績は鳥類の試験管内における感染症研究や遺伝学等を発展させるものである。また、鶏の胚発生期の生体における免疫細胞の運命制御の理解も深めた。

はじめに

生物を構成する最小単位である細胞は、生体内において微小環境により細胞運命は制御されている。また個体から取得した体細胞は、試験管内で培養することで、古くから医学・創薬研究を中心に利用されている。特にヒトやマウスでは、初代培養細胞の利用、無限分裂細胞の樹立、幹細胞を用いた特定の細胞（神経細胞や肝細胞）への分化誘導後の利用まで大きく発展している。一方で、これらの細胞培養における微小環境や、使用する遺伝子を含めた細胞の樹立条件は、マウスやヒトで最適化されたものであり、他の生物、特に進化的に離れた鳥類においてそのまま利用できないものも多くあるため、鳥類ではその利用は限られていた。鳥類においても、体細胞を有効に活用できれば、鳥インフルエンザなどの感染症の影響評価や、ゲノム編集との組み合わせによる逆遺伝学研究など様々な研究に利用可能であり、農学の飛躍的な発展が可能になる。

鶏などの効率的な iPS 細胞の樹立

マウス iPS 細胞樹立の初報が報告された当初は、4つの遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）を体細胞に導入することで、全ての生物で容易に iPS 細胞が樹立可能であると考えられていた。しかしながら、実際にはマウスの方法で iPS 細胞が樹立できる種は限られていた。特に、マウスから進化的に離れた鶏などの鳥類の iPS 細胞の樹立に関しては、多くのグループが挑戦したが、報告は数報かつ再現性が低く、幹細胞研究者間では鳥類の iPS 細胞の樹立方法は未確立と認識されていた。iPS 細胞などの多能性幹細胞は、様々な細胞に分化可能であるため、試験管内において神経や肝細胞などに分化誘導することで、感染症リスク評価など様々な研究に利用することができる。特に、iPS 細胞は、受精卵が必要な ES 細胞とは異なり、死亡個体由来の体細胞からであっても樹立が可能である。したがって、受精卵が利用できない希少な家禽や絶滅危惧種からでも樹立が可能である。本研究では、鶏などの初期化が困難な生物から、効率的な iPS 細胞の樹立を目指し、iPS 細胞の樹立方法の開発を進めた。

本研究では、初期化が困難な生物から効率的に iPS 細胞を樹立するために、初期化因子数の増加（マウスの4因子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）から6因子（Lin28 と Nanog の追加）に変更）と遺伝子発現量の均一化等が重要と考え、多数の初期化因子を一括導入する初期化ベクターを作製した。6遺伝子を一括で体細胞に導入する場合、導入配列が大型になるため、一般的に使用されるウイルスベクターでの導入が困難である。そこで、本研究では、大型配列も導入可能な PiggyBac トランスポゾンシステム

ムを使用した。本研究では、さらに、初期化因子をドライブするプロモーターを EF1 プロモーターから CAG プロモーターに変更することで、初期化遺伝子の発現量の亢進を模索した。本研究では、同システムを使用することで、マウスやハタネズミから効率的な iPS 細胞の樹立に成功した^{5,6,10}。一方で、これらのベクターでは鶏の iPS 細胞の樹立は困難であった。本研究では検討を重ね、MyoD という遺伝子の転写活性領域の一部を Oct3/4 に連結させ、Oct3/4 の転写活性を強化することで、鶏の体細胞の効率的な初期化に成功した。樹立した細胞は、初期化マーカーを発現し、さらに三胚葉分化能力を有することが確認された。これらの結果から、効率的な鶏の iPS 細胞の樹立方法の開発に成功したと考えられる⁴。加えて、本ベクターを使用することで、ハタネズミにおいて iPS 細胞が高品質化できる可能性を示す結果も得られており、種を超えて初期化に有用な手法である可能性が考えられる⁶。現在、他種鳥類への応用を進めている。

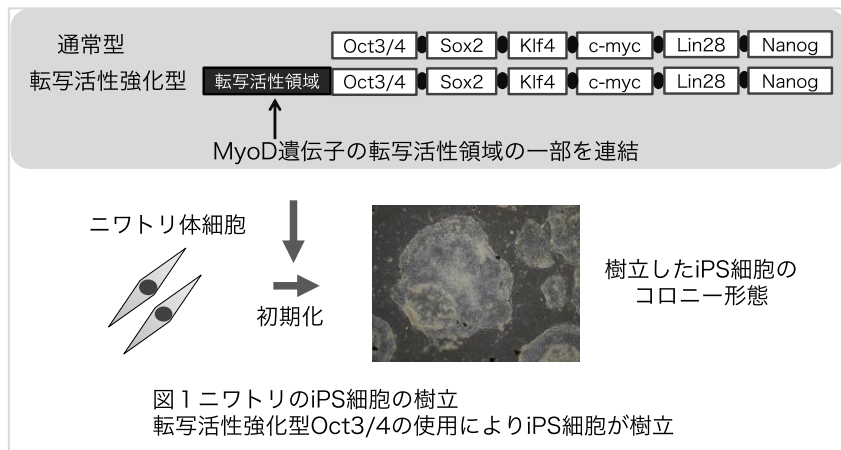


図1 ニワトリのiPS細胞の樹立
転写活性強化型Oct3/4の使用によりiPS細胞が樹立

図1 ニワトリのiPS細胞の樹立
転写活性強化型Oct3/4の使用によりiPS細胞が樹立

iPS 細胞の様な多能性幹細胞の培養の際には、フィーダー細胞と呼ばれる支持細胞を用いることで多能性幹細胞培養の微小環境が構築されている。STO 細胞などの無限分裂細胞を元細胞としたフィーダー細胞は剥がれやすく長期間の使用が困難である。そこで、マウス胎児から取得した初代培養細胞を利用したフィーダー細胞が使用されているが、初代培養細胞は細胞増殖に限りがあり、無限分裂細胞を用いた長期間使用できるフィーダー細胞の開発が期待されていた。フィーダー細胞の剥離現象は、多くの無限分裂細胞で無効化される p53 という遺伝子を中心とする細胞周期の Arrest 現象との強い関係が考えられた。そこで、本研究では p53 遺伝子が無損傷なラットの無限分裂細胞を樹立し、同細胞をフィーダー細胞の元細胞とすることで、長期間利用可能な無限分裂細胞由来のフィーダー細胞を試みた。結果、p53 遺伝子が無損傷なラットの無限分裂細胞を元細胞としたフィーダー細胞は、長期間幹細胞を支持可能であり、長期間利用可能な無限分裂細胞由来のフィーダー細胞の開発に成功した²。

少数遺伝子を利用した鳥類の無限分裂細胞の樹立

初代培養細胞は数回細胞分裂の後に、細胞老化現象により細胞増殖が停止する。したがって、長期培養が必要な実験や、細胞状態の影響を受ける実験に利用するには細胞老化を乗り越える無限分裂細胞（不死化細胞）が必要である。ヒトやマウスでは SV40T やヒトパピローマウイルス由来 E6E7 などのウイルス性がん遺伝子を利用し、無限分裂細胞が樹立されてきたが、鳥類の樹立方法は未確立であった。本研究では細胞周期の制御に着目した。一般的に哺乳類では、細胞老化現象により p16 などのタンパクが蓄積することで細胞周期が停止し、細胞増

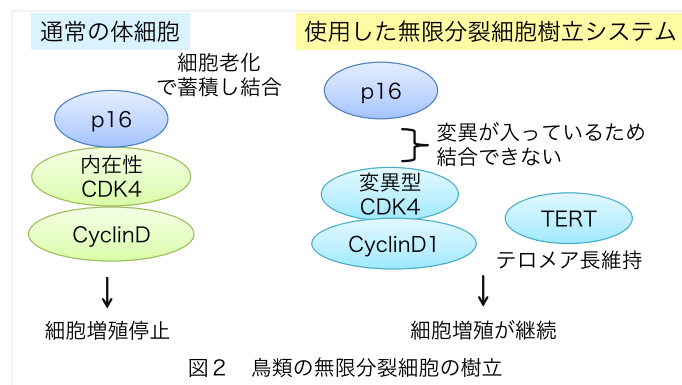


図2 鳥類の無限分裂細胞の樹立

一般的に哺乳類では、細胞老化現象により p16 などのタンパクが蓄積することで細胞周期が停止し、細胞増

殖が停止すると考えられている。鳥類では、p16 と結合する CDK4 遺伝子の存在は確認されていないが、類似遺伝子である CDK6 遺伝子は確認されており、p16 の蓄積による細胞老化機構が存在する可能性が考えられた。この様な背景のもと、本研究では p16 と結合できないヒト由来変異型 CDK4、CyclinD1、TERT の導入により、鶏とヤンバルクイナ（絶滅危惧鳥類）の無限分裂細胞の樹立を試みた¹⁾。なお、ハタネズミにおいても、同システムで無限分裂細胞の樹立に成功している⁷⁾。検討の結果、鶏とヤンバルクイナから人工的に無限分裂細胞の樹立に成功した³⁾。特に、ヤンバルクイナに関しては、我々の知る限り世界初の絶滅危惧鳥類の無限分裂細胞となった。

鳥類体細胞の効率的な培養条件の探索

鳥類の細胞培養には最適化された培地が必要であるが、一般的に細胞培養に利用されている培地の多くがヒトやマウスなどの哺乳類の細胞に最適化された培地であるため検討が必要であった。本研究では、DMEM、199、KAv-1 (αMEM を基礎培地とする培地) 培地を用いて、鶏をモデルに鳥類に適した培地の探索を実施した。結果、KAv-1 が、細胞増殖が最も活発であり、細胞老化や DNA 損傷が最小であることを確認した。本研究では、これら 3 培地の中で KAv-1 が鶏の体細胞の培養に適していることを明らかになった¹⁾。

鶏胚期におけるエストロゲンの免疫細胞の成熟への影響に関する研究

エストロゲンは、リンパ球の成熟に関連し、その作用はリンパ球への直接作用と、成熟器官への作用を通じた作用の両方が示唆されている。本研究では、鶏発生後期のファブリキウス嚢（鳥類の B リンパ球成熟器官）と胸腺（リンパ球成熟器官）におけるエストロゲン受容体（ER）の局在を明らかにし、リンパ球以外の細胞の ER 発現を明らかにした⁸⁾。また、胸腺の発生ステージごとの ER 発現の継時的変化も明らかにした⁹⁾。本研究では鶏胚の免疫細胞の成熟におけるエストロゲンの意義に関する理解を深めた。

まとめ

本研究では鳥類を中心とした細胞の運命制御と新規研究基盤細胞の開発を進めた。特に、これまで樹立が難しいと考えられていた、鶏の iPS 細胞や無限分裂細胞の樹立は大きな進歩であると考えている。培養細胞は動物実験の代替法として有用性が広く認識されている。これらの細胞は、高病原性鳥インフルエンザ等の感染症評価や逆遺伝学研究など様々な研究への利用が期待されている。今後は、感染症や遺伝子の機能等の評価につなげたいと考えている。また、個体を用いた実験が困難な、絶滅危惧種を含めた野生動物への応用も進めたいと考えている。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたり、日本家禽学会よりご推薦頂戴しました。豊後貴嗣会長ならびに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり多大なご指導ご鞭撻を頂戴しました岩手大学・福田智一教授（元東北大学准教授）、福島県立医科大学・西森克彦特任教授（元東北大学教授）、岡山大学・故近藤康博名誉教授、国立研究開発法人国立がん研究センター・清野透プロジェクトリーダー、国立研究開発法人国立環境研究所・大沼学主幹研究員に厚く御礼申し上げます。また、多くのご支援を頂戴した共同研究者の皆様、共に切磋琢磨した全ての方々に感謝申し上げます。研究者という道を温かく見守り応援してくれた、亡き母に感謝いたします。

引用文献

1. **Katayama M**, Onuma M, Fukuda T. 2021. KAv-1 is Better Suited to Chick Fibroblast Culture than DMEM or 199 Media. *J Poult Sci.* 25;58(4):270-279.
2. **Katayama M**, Kiyono T, Kuroda K, Ueda K, Onuma M, Shirakawa H, Fukuda T. 2019. Rat-derived feeder cells immortalized by expression of mutant CDK4, cyclin D, and telomerase can support stem cell growth. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1866(5):945-956.
3. **Katayama M**, Kiyono T, Ohmaki H, Eitsuka T, Endoh D, Inoue-Murayama M, Nakajima N, Onuma M, Fukuda T. 2019. Extended proliferation of chicken- and Okinawa rail-derived fibroblasts by expression of cell cycle regulators. *J Cell Physiol.* 234(5):6709-6720.
4. **Katayama M**, Hirayama T, Tani T, Nishimori K, Onuma M, Fukuda T. 2018. Chick derived induced pluripotent stem cells by the poly-cistronic transposon with enhanced transcriptional activity. *J Cell Physiol.* 233(2):990-1004.
5. **Katayama M**, Hirayama T, Kiyono T, Onuma M, Tani T, Takeda S, Nishimori K, Fukuda T. 2017. Immortalized prairie vole-derived fibroblasts (VMF-K4DTs) can be transformed into pluripotent stem cells and provide a useful tool with which to determine optimal reprogramming conditions. *J Reprod Dev.* 63(3):311-318.
6. **Katayama M**, Hirayama T, Horie K, Kiyono T, Donai K, Takeda S, Nishimori K, Fukuda T. 2016. Induced Pluripotent Stem Cells With Six Reprogramming Factors From Prairie Vole, Which Is an Animal Model for Social Behaviors. *Cell Transplant.* 25(5):783-96.
7. **Katayama M**, Kiyono T, Horie K, Hirayama T, Eitsuka T, Kuroda K, Donai K, Hidema S, Nishimori K, Fukuda T. 2016. Establishment of an immortalized cell line derived from the prairie vole via lentivirus-mediated transduction of mutant cyclin-dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase reverse transcriptase. *Exp Anim.* 65(1):87-96.
8. **Katayama M**, Fukuda T, Hatabu T, Narabara K, Abe A, Kondo Y. 2014. Changes in estrogen receptor expression in the chick thymus during late embryonic development. *Anim Sci J.* 85(3):277-85.
9. **Katayama M**, Fukuda T, Narabara K, Abe A, Kondo Y. 2012. Localization of estrogen receptor in the central lymphoid organs of chickens during the late stage of embryogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76(11):2003-7.
10. **Katayama M**, Fukuda T. 2020. Elsevier. Amsterdam. 272. iPSCs from Diverse Species, Volume 2 - 1st Edition. Chapter8 Establishment of Induced Pluripotent Stem Cell from Prairie Vole Derived Fibroblast (chapter8)
11. Shiomi K, Kiyono T, Okamura K, Uezumi M, Goto Y, Yasumoto S, Shimizu S, Hashimoto N. 2011. CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. *Gene Ther.* 18(9):857-66.