

# Press Release

2022年4月25日

京都大学アイセムス（物質－細胞統合システム拠点）

京都大学野生動物研究センター

## グレビーシマウマ iPS 細胞の樹立に成功

- ・絶滅危惧種であるグレビーシマウマから iPS 細胞を樹立しました。
- ・シマウマ iPS 細胞は、ヒトやマウスと共通の遺伝子を発現しており、その働きが種を超えて保存されていることが示されました。
- ・本研究成果は、グレビーシマウマの保全や、哺乳類 iPS 細胞の理解に貢献することが期待されます。

京都大学アイセムス（物質－細胞統合システム拠点）の亀井謙一郎（かめい・けんいちろう）准教授、同大学 iPS 細胞研究所の沖田圭介（おきた・けいすけ）講師、京都市動物園の伊藤英之（いとう・ひでゆき）研究教育係長、京都大学野生動物研究センターの村山美穂（むらやま・みほ）教授、遠藤良典（えんどう・よしのり）特任研究者らの研究グループは、絶滅危惧種に指定されているグレビーシマウマから iPS 細胞<sup>\*1</sup>を作成することに成功しました。この研究成果は、グレビーシマウマの種の保全や、哺乳類多能性幹細胞<sup>\*2</sup>の理解に貢献することが期待されます。

iPS 細胞作製技術の開発により、絶滅危惧種も含む多くの野生動物の生理学的・病理学的研究や「種の保全」への取り組みも新しい局面を迎えることとなりました。iPS 細胞を用いることで、動物個体を用いることなく、動物特有の生理現象、病気になるメカニズム、進化や環境変化による適応過程などの知見が得られると期待されています。しかし、iPS 細胞は、動物種によって異なる性質を持つことがわかってきました。研究や保全に向けた実用化のためには、様々な動物種の iPS 細胞を理解する必要があります。

今回の研究では、グレビーシマウマから iPS 細胞の作成に成功しました。グレビーシマウマの皮膚から培養した繊維芽細胞に、ヒトなどと同様の方法で初期化因子<sup>\*3</sup>を導入し、多能性幹細胞様コロニーの形成を確認しました。さらに、研究グループは、RNA-seq<sup>\*4</sup>を用いて遺伝子発現を網羅的に解析することで、ヒトやマウスの多能性幹細胞に見られる遺伝子が、グレビーシマウマ iPS 細胞においても発現していることを発見し、これらの遺伝子の重要性が、動物種の間で進化的に保存されていることが示されました。

グレビーシマウマ iPS 細胞を利用することで、将来的には、体細胞を用いた病気の研究や、生殖細胞へ分化誘導することで繁殖への貢献が期待されます。また、新たな動物種の知見を得ることで、種の違いや進化の意義づけを行い、我々ヒトを含めた哺乳類多能性幹細胞の理解に役立つことが期待されます。

本成果は、2022年3月22日に米科学誌「Stem Cells and Development」にオンラインで公開されました。

### 1. 背景

多能性幹細胞は、他の組織細胞へ分化する多分化能と、ほぼ無限に増殖できる自己複製能という2つの重要な性質を持っており、ヒトでは再生医療や病気のメカニズム解明、創薬への実用化が期待されています。多能性幹細胞の一種である人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、受精卵を使用せずに体細胞から作成できることから、倫理的なハードルも低くなり、多くの研究者が使用できるようになりました。このiPS細胞作成技術は、2006年に本学の山中伸弥教授がまずマウスを使用して開発し、その後ヒトや他の動物種の体細胞からも作成することが可能になりました。iPS細胞の持つ性質や元となる細胞材料が比較的容易に得られることから、個体実験や生体試料の取得が難しい野生動物や絶滅危惧種の新たな保全・実験試料として大きな期待が寄せられています。

一方で、動物種から樹立されたiPS細胞は、種によって異なる性質を示すことがわかってきました。例えば、山中教授が特定した4つのリプログラム因子（*Oct4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc*）を使うことで、他の動物でもiPS細胞を作成できることもあります。必ずしもその4種の組み合わせとは限らない、ということも明らかになってきました。また、作成されたiPS細胞は、動物種によって異なる性質を示すことが示唆されています。そこで、ヒトやマウスのiPS細胞研究に加えて他の哺乳類のiPS細胞も研究することによって、より多くの種について知る必要があります。

これまでにiPS細胞が研究されてきた種は、霊長類や齧歯目を除けば、家畜を中心としたウシやブタなどの偶蹄目が多く、奇蹄目はウマとシロサイに限られています。グレビーシマウマは、奇蹄目ウマ科に属する、現存する3種のシマウマの1種です。生息地の破壊や乱獲により生息数が激減し、国際自然保護連合（IUCN）<sup>\*5</sup>が作成するレッドリストにより絶滅危惧種に指定されています。これまでに、本種を含むシマウマiPS細胞の作成は報告されていません。

## 2. 研究内容と成果

本研究では、グレビーシマウマiPS細胞を作成することを目的とし、さらにグレビーシマウマiPS細胞内で発現する遺伝子を網羅的に解析することで、その性質の解明に取り組みました。

今回は、動物園で死亡した個体から皮膚片を採取し、繊維芽細胞を培養しました。獲得した繊維芽細胞に初期化因子を導入することで、iPS細胞の作成を試みました（図1A-C）。その結果、グレビーシマウマの体細胞は、ヒトと同様の4つの因子（*Oct4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc*）により、iPS細胞へリプログラムできることがわかりました。作成されたグレビーシマウマiPS細胞は、ヒトiPS細胞に似た扁平なコロニーを形成していることが観察されました（図1D）。また、ヒトiPS細胞を維持するために開発されたmTeSR-1培地で増殖することができました。多能性幹細胞は、主により発生初期に近いナイーブ型と少し発生が進んだプライム型の2種類あり、それらを維持するために必要な成長因子や細胞が示す形態も異なります。mTeSR-1培地はプライム型のヒトiPS細胞を培養するために開発された培地であり、かつグレビーシマウマiPS細胞も同様に培養でき、コロニー形態もヒトのものに似ていることから、プライム型に近い性質を持っていると考えられます。さらに未分化マーカーの発現を調べるため、アルカリフォスファターゼ染色<sup>\*6</sup>、免疫細胞染色<sup>\*7</sup>とqRT-PCR<sup>\*8</sup>を行いました（図1F-H）。その結果、グレビーシマウマiPS細胞は、自らの未分化マーカーを発現していることが観察され、かつ外来のリプログラム因子の発現は抑制されており、リプログラムの成功が確認されました。また、iPS細胞の分化能を調べるため、グレビーシマウマiPS細胞から胚葉体<sup>\*9</sup>形成試験を行ったところ、三胚葉<sup>\*10</sup>へと分化できることを確認しました。以上により、グレビーシマウマiPS細胞が作成できていることを確認しました。

細胞は、その種類（iPS 細胞や神経細胞、生殖細胞など）によって特徴的な遺伝子を発現し、固有の性質と機能を発揮します。したがって、発現している遺伝子を調べることで、その細胞の特徴を知ることができます。今回研究グループは、発現遺伝子を網羅的に調べることができる RNA-seq を用いて、グレビーシマウマ iPS 細胞と材料として使用した繊維芽細胞を比較しました。その結果、グレビーシマウマ iPS 細胞では、繊維芽細胞と比較して 1,144 遺伝子の発現が上昇し、1,495 遺伝子の発現が減少していることがわかりました。発現が上昇した遺伝子は、既に述べた iPS 細胞マーカー遺伝子の他に、ヒトやマウスにおいても iPS 細胞維持に重要な役割を持つと言われている *DNMT3B*、*SALL4*、*ZFP42*などが含まれていました。これらの遺伝子が種を超えて iPS 細胞維持に働いており、その重要性が進化的に保存されていることが示唆されました。

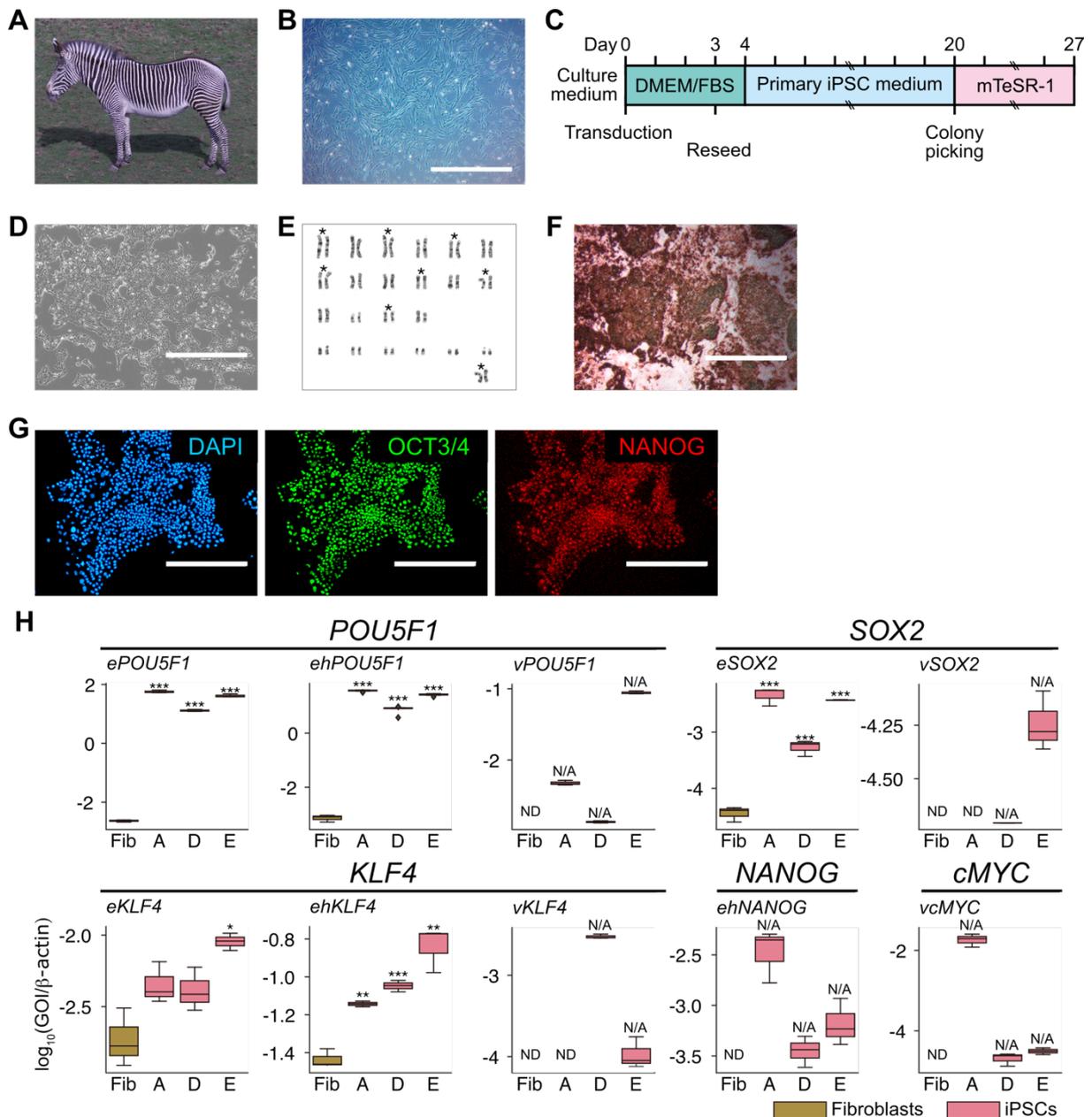


図 1. (A) グレビーシマウマ (B) グレビーシマウマ繊維芽細胞 (C) 初期化方法の概要図 (D) グレビーシマウマ iPS 細胞 (E) 核型。\* は染色体の位置とペアが確定的と思われるものを示

している (F) アルカリフォスファターゼ染色 (G) 多能性幹細胞マーカータンパク質の蛍光。細胞核を DAPI で染色している (H) 多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを示した箱ひげ図。A、D、E はグレビーシマウマ iPS 細胞のクローン、Fib は繊維芽細胞を示す。e, h, v はウマ、ヒト、ウィルスの遺伝子を示す。qRT-PCR を用いて遺伝子発現を測定し、iPS 細胞と繊維芽細胞の両方に発現が見られた場合はウェルチ t 検定を用いて有意差を求めた (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , and \*\*\*  $P < 0.001$ )。繊維芽細胞に発現が見られなかった場合 (ND) は検定を行わなかった (N/A)。スケールバー (B)、(D)、(F) 1,000  $\mu\text{m}$ 、(G) 400  $\mu\text{m}$ 。

### 3. 今後の展開

本研究では、絶滅危惧種であるグレビーシマウマから iPS 細胞を作成することができました。今回の成果により、体細胞への分化誘導や生殖細胞の獲得に向けたアプローチが可能となり、将来的には種の保全へと貢献することが期待されます。今後は、初期化・培養法の最適化や、分化誘導の研究を進める予定です。

また、新たな動物種の iPS 細胞の知見を得ることができ、発現遺伝子を網羅的に調べることができました。本研究グループはこれまでに、多能性幹細胞で働く遺伝子の進化を塩基配列の違いから明らかにしてきました。今回の網羅的遺伝子解析はグレビーシマウマのみを対象としましたが、発現遺伝子を異なる種や系統と比較することで、哺乳類の多能性幹細胞における進化の理解を進めることが期待できます。

### 4. 用語解説

- ※1 iPS細胞：人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell) の略。生体外におけるほぼ無限の自己複製能と、身体中の様々な組織細胞へと分化が可能な性質を持っている。そのため、ヒトにおいては再生医療や創薬への実用化が期待されているが、野生動物種では、種の保存の新しい生体材料として期待されている。iPS細胞は、本学山中伸弥教授、前iPS細胞研究所所長によって開発され、その誘導機構の発見から、2012年にジョン・ガードン ケンブリッジ大学名誉教授と共にノーベル生理学・医学賞が授与された。
- ※2 多能性幹細胞：生体外におけるほぼ無限の自己複製能と、様々な組織細胞へと分化が可能な、特徴的な性質も持っており、iPS細胞や胚性幹細胞 (ES細胞) などが代表的な細胞である。
- ※3 初期化因子：リプログラミング因子ともいい、iPS細胞を作成する際に体細胞に導入する遺伝子群のことである。山中伸弥教授が2006年にマウスiPS細胞作成に用いた遺伝子は、Oct4, Klf4, Sox2, c-Mycの4種であったが、近年、動物種によって必要な因子が異なることが明らかになってきた。
- ※4 RNA-seq：次世代シーケンサーを用いた、細胞内で発現するトランスクリプトーム (細胞内の全転写産物・全RNA) の定量を行う解析。生体内の細胞は同じ遺伝子を持っているが、働いている (発現される) 遺伝子は細胞の種類や状態によって異なる。目的の細胞で発現される遺伝子の種類や量を調べることで、細胞の特徴を知ることができる。
- ※5 国際自然保護連合 (IUCN)：国際的な自然保護団体であり、国家、政府機関、NGOなどを会員とする。絶滅のおそれのある野生生物のリストであるレッドリストの作成・更新は活動の一つ。
- ※6 アルカリフォスファターゼ染色：アルカリフォスファターゼは、未分化な多能性幹細胞で高発現しており、酵素活性を用いて染色することができる。多能性幹細胞であることの判定に用いられる手法の一つ。
- ※7 免疫細胞染色：細胞中のタンパク質を検出する目的で蛍光標識抗体や蛍光色素を利用する技術。未分化状態で高発現するマーカーを検出することで、多能性幹細胞であることの判

- 定に用いられる。
- ※8 定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) : PCRによる増幅を測定することで、目的遺伝子の発現を定量する手法。未分化状態で高発現するマーカーを検出することで、多能性幹細胞であることの判定に用いられる。
  - ※9 胚葉体：多能性幹細胞を浮遊培養することによって形成されるボール状の細胞塊。他の細胞に分化する多能性を証明することで、多能性幹細胞であることの判定に用いられる。
  - ※10 三胚葉：脊椎動物においては、受精後の胚は、内胚葉、中胚葉、外胚葉の3種類の胚葉を形成する。iPS細胞から胚葉体を形成し、これら3種類の胚葉への分化を確認することで、多能性の証明とする。

---

## 5. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金 (基盤研究 (B) 研究代表 村山美穂、17H03624、20H00420、亀井謙一郎、課題番号 17H02083)、京都大学融合チーム研究プログラム SPIRITS (研究代表 村山美穂)、及び環境再生保全機構 環境研究総合推進費 (研究代表 村山美穂、FPMEERF20214001) の支援を受けて行われました。

---

## 6. 論文タイトル・著者

“Generation and gene expression profiles of Grevy's zebra iPSCs”

(参考訳：グレビーシマウマ iPS細胞株の樹立と遺伝子発現解析)

著者：Yoshinori Endo<sup>1</sup>, Ken-ichiro Kamei<sup>2,3,4\*</sup>, Kouichi Hasegawa<sup>2</sup>, Keisuke Okita<sup>5</sup>, Hideyuki Ito<sup>6</sup>, Shiho Terada<sup>2</sup>, Miho Inoue-Murayama<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>京都大学野生動物研究センター

<sup>2</sup>京都大学アイセムス

<sup>3</sup>瀋陽薬科大学 无涯創新学院

<sup>4</sup>瀋陽薬科大学薬剤学科

<sup>5</sup>京都大学iPS細胞研究所

<sup>6</sup>京都市動物園

*Stem Cells and Development* | DOI: [10.1089/scd.2021.0253](https://doi.org/10.1089/scd.2021.0253)