［東北畜産学会報 66(1): 10 ～16 2016］

原著論文

リポフェクション法による遺伝子導入と*piggyBac*トランスポゾンシステムを組み合わせた，非ウイルスベクターによる高効率なマウス iPS 様細胞の樹立技術の開発

菊地 貴裕[1,*]・楠原 夏生[1,*]・野中 愛純[1]・熊谷 友希[1]・
平出 美鈴[1]・佐々木 玲[1,2]・福田 智一[3]・小林 正之[1,**]

[1] 秋田県立大学大学院生物資源科学研究科，秋田県秋田市下新城中野　〒 010-0195
[2] 秋田県総合食品研究センター，秋田県秋田市新屋町　〒 010-1623
[3] 岩手大学理工学部／連合農学研究科，岩手県盛岡市上田　〒 020-8551

2016 年 3 月 1 日受付，2016 年 3 月 10 日受理

要　約

精子・卵子を形成できる，産業動物の高品質な iPS 細胞は，未だに樹立されていない。本研究では，*piggyBac* トランスポゾンシステムとリポフェクション法を組み合わせることにより，特殊な実験機器や組換え体の高度な拡散防御を要することなく，マウス iPS 様細胞を高効率に作出できる技術を開発した。まず最初に，マウス線維芽細胞への遺伝子導入に適した導入試薬を選択した。種々のリポフェクション試薬（計 7 種）により，GFP 発現ベクターをマウス胎仔線維芽細胞株 E6/E7-MEF 細胞と初代マウス胎仔線維芽細胞に遺伝子導入し，遺伝子導入効率を比較した。その結果，いずれの細胞種においても ViaFect を用いた場合，最も遺伝子導入効率が高いことが判明した。次に ViaFect を用いて，マウス iPS 細胞誘導 *piggyBac* ベクターと *piggyBac* トランスポザーゼ発現ベクターを同時にマウス胎仔線維芽細胞株に遺伝子導入し，iPS 細胞の樹立を試みた。遺伝子導入から約 3 週間後，iPS 細胞に特徴的なドーム状の細胞コロニーが形成され，かつ，iPS 細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性が検出された。さらに，iPS 細胞誘導ベクターに組み込んでいない，iPS 細胞マーカーである NANOG の明確な発現が検出された。これらの結果より，iPS 様細胞が樹立できたと考えられる。iPS 様細胞の樹立効率を算出したところ約 0.2 % であり，レトロウイルスベクターを使用する従来法と比較しても，同等な樹立効率であることが判明した。本研究で開発したマウス iPS 様細胞の樹立技術は，産業動物の iPS 細胞も含めて，iPS 細胞の樹立に有効な合成化合物・天然化合物等，培養条件の確立や新規転写因子のスクリーニングに応用できると考えられる。

東北畜産学会報 66(1): 10 ～16 2016

緒　言

マウス人工多能性幹細胞（Induced pluripotent stem cells；iPS 細胞）は，*Oct4*・*Sox2*・*Klf4*・*c-Myc*（山中 4 因子）を体細胞に遺伝子導入することにより，樹立することができる（Takahashi と Yamanaka，2006）。iPS 細胞は体細胞から作製されているのにもかかわらず，胚性幹細胞（Embryonic stem cells；ES 細胞）と同等な分化多能性を有している（Takahashi と Yamanaka，2006; Takahashi ら，2007）。一方，精子・卵子を形成できる，産業動物の高品質な ES 細胞・iPS 細胞は，未だに樹立されていない（Ezashi ら，2009; Sumer ら，2011）。これは，産業動物の ES 細胞・iPS 細胞の樹立と維持に有効な合成化合物・天然化合物等，培養条件や転写因子が確立さ

* 両著者は本研究に対して同等に寄与した。
**連絡者：小林 正之（こばやし　まさゆき）
（秋田県立大学大学院生物資源科学研究科動物分子工学研究室）
Tel　018-872-1596，Fax 018-872-1676
E-mail　makoba@akita-pu.ac.jp

れていないことに起因すると考えられる。

従来，iPS 細胞の作出にはウイルスベクターが用いられてきた。しかし，ウイルスベクターによる遺伝子導入は，操作が非常に煩雑である。さらに，遺伝子組換え体の高度な拡散防御が要求される。そこで本研究では *piggyBac* トランスポゾンシステムに着目した（Ding ら，2005）。このシステムは蛾のトランスポゾンを応用した遺伝子組込み技術であり，ウイルスベクターと同様，染色体に効率よく山中 4 因子を組込むことができる（Ding ら，2005）。加えて，変異を残すことなく再び除去することができる（Ding ら，2005）。すなわち，非遺伝子組換え細胞と同等な状態に戻すことができることより，ヒト iPS 細胞の樹立にも応用された（Kaji ら，2009）。

本研究ではウイルスベクターを用いることなく，高効率な iPS 細胞の樹立技術を確立することを目指した。そこで，*piggyBac* トランスポゾンシステムと簡便なリポフェクション法，強力な CAG プロモーター（Niwa ら，1991; Kobayashi ら，1996）を組み合わせることにより，ウイルスベクターを用いる場合と同等な効率で iPS 様細胞を作出できる技術を開発した。

材料および方法

1．マウス iPS 細胞誘導ベクターの構築

マウス *Klf4*・*Sox2*・*c-Myc* cDNA は，マウス ES 細胞から作製した cDNA プールより，PCR を用いて増幅した。マウス *Oct4* cDNA は，丹羽仁史先生（熊本大学発生医学研究所）より分与いただいた。山中 4 因子コード DNA と緑色蛍光タンパク質（GFP，pEGFP-C1，クロンテック）コード DNA を自己開裂 2A ペプチド配列コード DNA（Kim ら，2011）で連結することにより，OK（*Oct4-2A-Klf4*）配列および SMG（*Sox2-2A-c-Myc-2A-GFP*）配列コード DNA を作製した。これらの DNA 配列と強力な CAG プロモーター，さらに *piggyBac* ターミナルリピート配列（PB531A-2，SBI）を組み合わせることにより，*piggyBac* マウス iPS 細胞誘導ベクター pCAGPB/OKISMG を構築した（**図 1**）。

2．細胞培養

初代マウス胎仔線維芽細胞（MEF）は，Donai らの方法（Donai ら，2013）により調製した。なお，マウス胎仔からの線維芽細胞の調製は，秋田県立大学動物実験委員会の審議・承認を得た上で実施した。MEF とマウス胎仔線維芽細胞株 E6/E7-MEF 細胞（Donai ら，2015）は，10% ウシ胎仔血清（Biological Industries）を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM，4.5g/L グルコース，ナカライテスク）を用いて培養（37℃，5% CO_2）した。iPS 細胞の樹立培養は，Donai らの方法（Donai ら，2015）に準じて行った。

3．リポフェクション試薬による遺伝子導入

本研究で使用したリポフェクション試薬は，Lipofectamine（インビトロジェン），Lipofectamine 2000（インビトロジェン），Lipofectamine 3000（インビトロジェン），

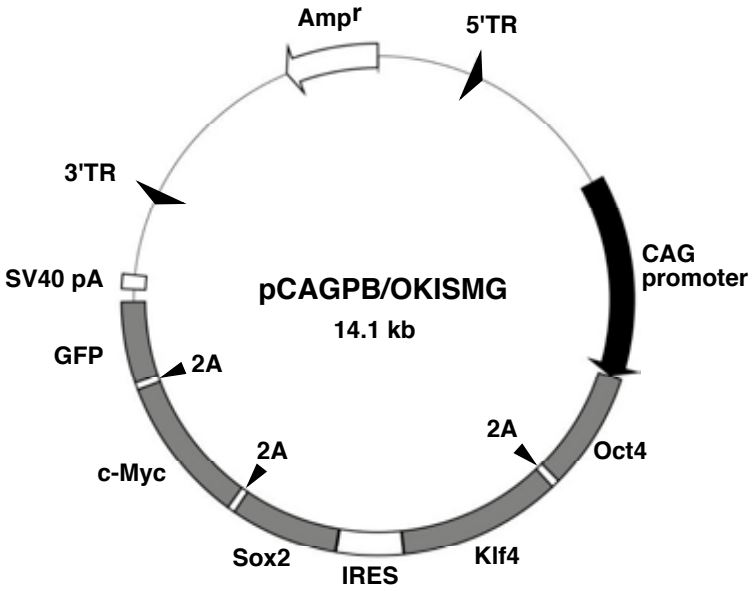

図 1　*piggyBac* マウス iPS 細胞誘導ベクター pCAGPB/OKISMG の構造

TR, piggyBac terminal repeat 配列 ; IRES, internal ribosomal entry site 配列 ; 2A, ウイルス由来 2A ペプチド配列 ; SV40 pA, SV40 poly A 付加シグナル配列 ; Amp^r, アンピシリン耐性遺伝子配列

ScreenFectA（和光純薬），HilyMax（同仁化学），ViaFect（プロメガ），FuGene HD（プロメガ）である。

マウス胎仔線維芽細胞株 E6/E7-MEF 細胞（0.62 × 10^5 細胞 / 穴），もしくは MEF（1.3×10^5 細胞 / 穴）を播種し（24 穴プレート），16 時間後，CAG プロモーターの下流に GFP を組み込んだ GFP 発現ベクター（pMN1Pur/GFP（Sato ら，2013））を遺伝子導入した。それぞれのリポフェクション試薬についてメーカー推奨の遺伝子導入条件を基準にして，前もって導入条件を至適化した。その後，至適化した条件により，それぞれのリポフェクション試薬による遺伝子導入効率を同時に比較した。なお，至適化した条件は，リポフェクション試薬の量，リポフェクション試薬と発現ベクター（500 ng プラスミド DNA）の複合体を形成させる際に用いる培養液の種類（Opti-MEM（インビトロジェン），DMEM（1 g/L グルコース，ナカライテスク）），リポフェクション試薬と発現ベクターの複合体と線維芽細胞を保温する時間（4 時間，6 時間，24 時間），である。遺伝子導入から 2 日後，ヘキスト 33342（終濃度 1 μg/ml）により細胞核を染色後，写真撮影することにより（BZ-9000，キーエンス），視野内に存在する細胞核数（約 1.3×10^3 個）を計数した。同時に，同じ視野内に存在する GFP 陽性細胞を写真撮影した。GFP 陽性細胞数を細胞核数で除すことにより，遺伝子導入効率を算出した。なお遺伝子導入効率は，Steel-Dwass 検定により比較した。

iPS 細胞誘導ベクターは，次の様に E6/E7-MEF 細胞に遺伝子導入した。E6/E7-MEF 細胞（3 × 10^5 細胞 / 穴）を 6 穴プレートに播種後（18 時間），iPS 細胞誘導ベクター pCAGPB/OKISMG（1.9 μg）と *piggyBac* トランスポザーゼ発現ベクター（0.63 μg，PB200PA-1,SBI）を，リポフェクション試薬を用いて同時に遺伝子導入した。

表 1.　種々のリポフェクション試薬について至適化した遺伝子導入条件

リポフェクション試薬	試薬量 （μl）	DNA と試薬の複合体を形成させる培養液	DNA と試薬の複合体と細胞を保温する時間（h）
Lipofectamine	3	*DMEM	6
Lipofectamine 2000	2	Opti-MEM	6
Lipofectamine 3000	1.5	Opti-MEM	6
ScreenFectA	2.7	** 製品添付試薬	24
HilyMax	2.5	DMEM	4
ViaFect	2	Opti-MEM	6
Fugene HD	2	DMEM	6

24 穴プレートとプラスミド DNA（pMN1Pur/GFP, 500 ng）を使用した。
*DMEM は，Dulbecco's modified Eagle's medium（1 g グルコース /L）を示す。
** ScreenFectA に添付された試薬を用いた。

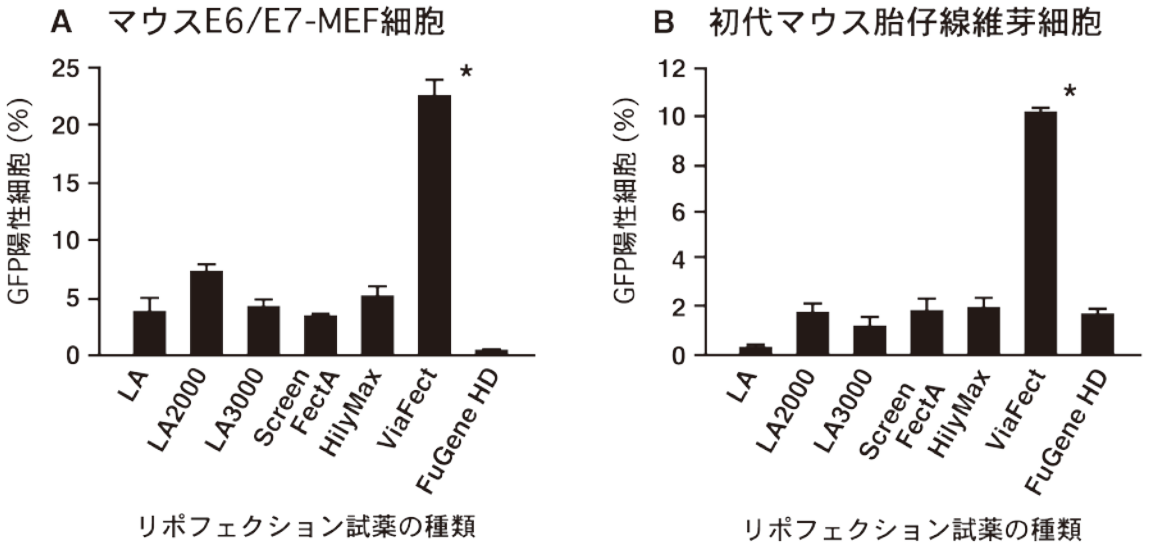

図 2　種々のリポフェクション試薬によるマウス線維芽細胞への遺伝子導入効率の比較

種々のリポフェクション試薬により，GFP 発現ベクター（pMN1Pur/GFP）を線維芽細胞へ遺伝子導入した。2 日後，GFP に由来する蛍光（GFP 陽性細胞），およびヘキスト 33342 により染色した細胞核を蛍光顕微鏡により観察した。GFP 陽性細胞数を細胞核数で除すことにより，遺伝子導入効率を算出した（n = 3, 平均 ± 標準誤差，$^*P < 0.05$）。LA は Lipofectamine を示す。
（A）マウス胎仔線維芽細胞株 E6/E7-MEF 細胞における GFP 陽性細胞の検出
（B）初代マウス胎仔線維芽細胞における GFP 陽性細胞の検出

4．蛍光免疫染色，アルカリフォスファターゼ活性染色とウエスタンブロッティング

蛍光免疫染色，iPS 細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性（AP）染色とウエスタンブロッティングは，既報に準じて行った（Iha ら，2012; Sato ら，2015）。

結果および考察

E6/E7-MEF 細胞に対してリポフェクション試薬（7 種）により GFP 発現ベクターを遺伝子導入し，GFP 蛍光を指標として遺伝子導入条件を至適化した（**表1**）。引き続き，至適化した条件を用い，7 種の試薬について同時に遺伝子導入効率を比較した。E6/E7-MEF 細胞（**図 2A**），および初代 MEF 細胞（**図 2B**）に対して最も導入効率が高かった試薬は，いずれも ViaFect（E6/E7-MEF 細胞，27%；MEF，11%）であった。なお，いずれのリポフェクション試薬についても使用している極性脂質の組成については公開されておらず，ViaFect による導入効率が最も優れていた理由については不明である。

次に ViaFect を用いて，*piggyBac* マウス iPS 細胞誘導ベクター pCAGPB/OKISMG と *piggyBac* トランスポザーゼ発現ベクターを同時に E6/E7-MEF 細胞に遺伝子導入した。翌日，蛍光顕微鏡により観察したところ，iPS 細胞誘導ベクターに由来する GFP が陽性である細胞の割合は 20 − 30% であった。遺伝子導入から約 3 週間後，iPS 細胞に特徴的なドーム状の細胞コロニーが認められた（**図 3A**）。また，これらの細胞コロニーは，GFP（**図 3B**）お

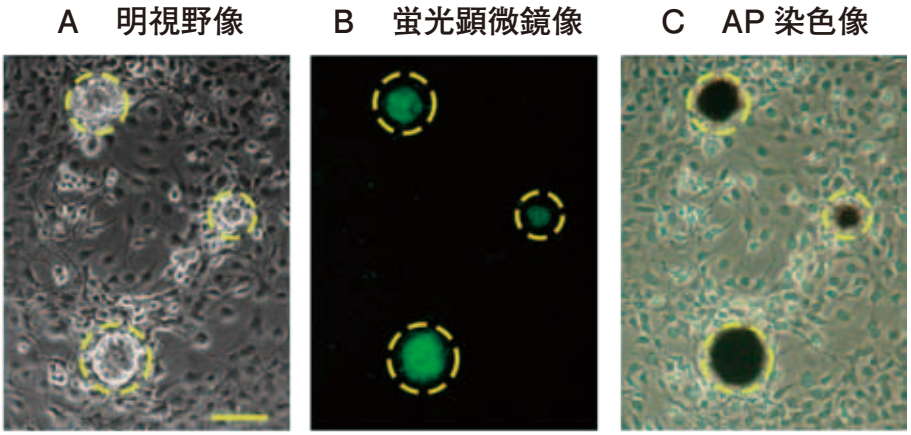

図 3　マウス胎仔線維芽細胞株 E6/E7-MEF 細胞からの iPS 様細胞の誘導

リポフェクション試薬 ViaFect により，*piggyBac* マウス iPS 細胞誘導ベクターを E6/E7-MEF 細胞に遺伝子導入した。約 3 週間後，細胞間が緊密に接着したドーム状の細胞コロニーが多数，形成された。
(A) 細胞間が緊密に接着した，ドーム状の細胞コロニーの例（黄色・破線サークル）
(B) 蛍光顕微鏡像（GFP に由来する緑色蛍光の検出）
(C) AP 染色像（アルカリホスファターゼ（AP）活性の検出）

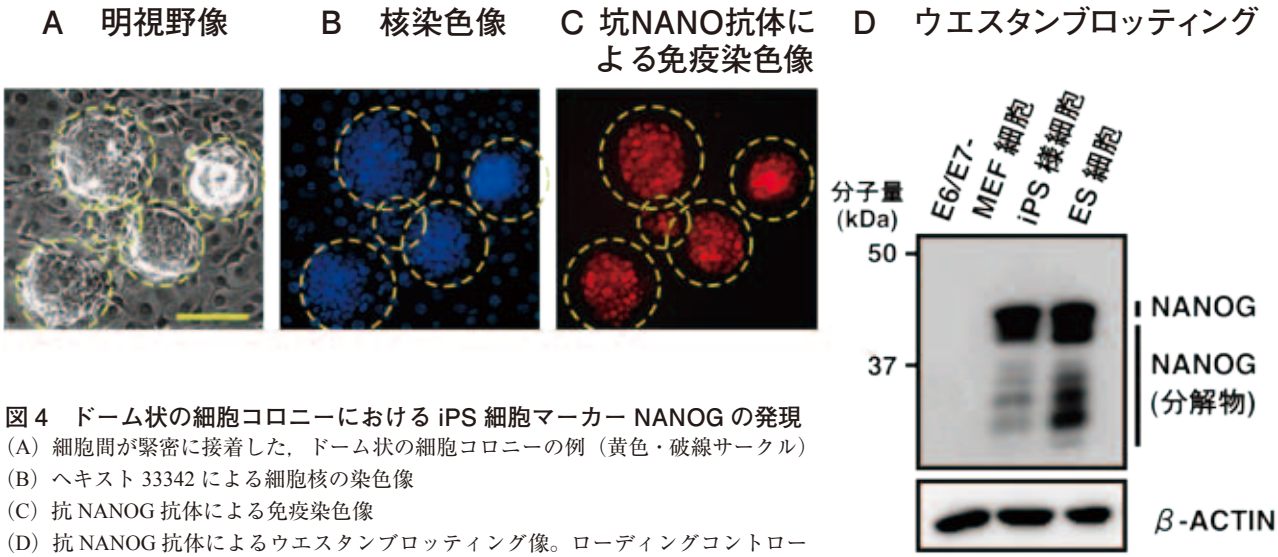

図 4　ドーム状の細胞コロニーにおける iPS 細胞マーカー NANOG の発現

(A) 細胞間が緊密に接着した，ドーム状の細胞コロニーの例（黄色・破線サークル）
(B) ヘキスト 33342 による細胞核の染色像
(C) 抗 NANOG 抗体による免疫染色像
(D) 抗 NANOG 抗体によるウエスタンブロッティング像。ローディングコントロールとして，β-ACTIN（42 kDa）を検出した。

よびiPS細胞マーカーであるAP活性（図3C）が陽性であった。なお，AP陽性コロニー数は約500個／穴（6穴プレート）であった。

*Nanog*遺伝子の活性化を指標にしてiPS細胞を樹立した場合，生殖系列キメラマウスを生成する能力を持つiPS細胞を樹立できることが知られている（Okitaら，2007）。そこで次に，iPS細胞誘導ベクターに組み込んでいない，NANOGの発現について検出した。図4に示すように，免疫染色により，細胞間が緊密に接着した，ドーム状の細胞コロニーにおいてNANOGの発現が明確に検出された。またウエスタンブロッティングにより，マウスES細胞と遜色ない強度でNANOGが検出された。一方，本研究で開発したiPS細胞誘導ベクターは，山中4因子を強く発現させるために常時活性化型のCAGプロモーターを採用している。そのため，樹立された細胞においては山中4因子が常時，発現するので，これらの細胞は正常に分化することができない。また，樹立細胞株であるE6/E7-MEF細胞を用いて作出している。従ってこれらを勘案し，本研究で開発した手法により，iPS様細胞を樹立することができる，と結論づけた。

本研究におけるAP陽性コロニーの樹立効率について，6穴プレートに播種した細胞数（3×10^5細胞／穴）を基準として算出したところ，約0.2%であった。これは，レトロウイルスベクターによる樹立効率（0.1%（TakahashiとYamanaka，2006））と比較しても，ほぼ同等の樹立効率である。すなわち，*piggyBac*マウスiPS細胞誘導ベクター，CAGプロモーターとリポフェクション試薬ViaFectを用いることにより，ウイルスベクターを用いることなく，高効率にiPS様細胞を樹立できることを示している。

これまでに産業動物においては，ES細胞・iPS細胞の樹立と維持に必要な技術は確立できていない（Ezashiら，2009; Sumerら，2011）。一方，マウスiPS細胞の樹立技術の開発やマウスES細胞は，マウスをモデルとした発生プロセスの研究において大きく貢献してきた。また，優良な産業動物の精子・卵子の凍結保存による遺伝資源は，それぞれの個体から採取できる精子・卵子の量に限界があるため，いつかは枯渇してしまう。近年，マウスES細胞・マウスiPS細胞より精子・卵子が作成され，産仔が得られたことは（Hayashiら，2011; Hayashiら，2012），産業動物の恒久的な遺伝資源の保存技術において，ES細胞・iPS細胞を活用できる可能性を示している。従って，本研究により開発したマウスiPS細胞の樹立技術は，産業動物も含めて，ES細胞・iPS細胞の誘導と維持に効果的な合成化合物・食品由来化合物等，培養条件の確立や新規転写因子のスクリーニングに応用できると考えている。

謝　辞

マウス*Oct4* cDNAを分与いただきました，丹羽仁史先生（熊本大学発生医学研究所）に感謝申し上げます。また，iPS細胞の樹立について，終始ご助言を賜りました土内憲一郎先生（東北大学大学院農学研究科）に感謝申し上げます。本研究の一部は，日本学術振興会科学研究費補助金（JSPS KAKENHI No. 24580413），および秋田県立大学学長プロジェクト・秋田県立大学産学連携事業による研究助成を受けて行った。

引用文献

Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. Cell, 122: 473-483. 2005.

Donai K, Inagaki A, So KH, Kuroda K, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T. Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions. Cytotechnology, 67: 191-197. 2015.

Donai K, Kuroda K, Guo Y, So KH, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T. Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines. Anal Biochem, 443: 104-112. 2013.

Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. Proc Natl Acad Sci USA, 106: 10993-10998. 2009.

Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. Science, 338: 971-975. 2012.

Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell, 146: 519-532. 2011.

Iha M, Watanabe M, Kihara Y, Sugawara S, Saito K, Soma M, Sato S, Mori Y, Kasuga K, Kojima I, Sasamura R, Murata J, Kobayashi M. Effect of ectopic expression of homeoprotein EGAM1C on the cell morphology, growth, and differentiation in a mouse embryonic stem cell line, MG1.19 cells. Reproduction, 143: 477-489. 2012.

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and

subsequent excision of reprogramming factors. Nature, 458: 771-775. 2009.

Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, Lee KY, Kim MK, Shin BA, Choi SY. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. PloS one, 6: e18556. 2011.

Kobayashi M, Yamauchi Y, Tanaka A, Shimamura S. Improved dicistronic mRNA expression vectors for efficient selection of transfectants highly expressing foreign genes. Biotechniques, 21: 398-402. 1996.

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene, 108: 193-200. 1991.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature, 448: 313-317. 2007.

Sato S, Morita S, Iha M, Mori Y, Sugawara S, Kasuga K, Kojima I, Ozaki N, Muraguchi H, Okano K, Iwashita J, Murata J, Hosaka M, Kobayashi M. Intact structure of EGAM1 homeoproteins and basic amino acid residues in the common homeodomain of EGAM1 and EGAM1C contribute to their nuclear localization in mouse embryonic stem cells. J Biosci Bioeng, 116: 141-146. 2013.

Sato S, Nakazawa M, Kihara Y, Kubo Y, Sato Y, Kikuchi T, Nonaka A, Sasaki A, Iwashita J, Murata J, Hosaka M, Kobayashi M. Partial inhibition of differentiation associated with elevated protein levels of pluripotency factors in mouse embryonic stem cells expressing exogenous EGAM1N homeoprotein. J Biosci Bioeng, 120: 562-569. 2015.

Sumer H, Liu J, Malaver-Ortega LF, Lim ML, Khodadadi K, Verma PJ. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. J Anim Sci, 89: 2708-2716. 2011.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131: 861-872. 2007.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126: 663-676. 2006.

Tohoku Journal of Animal Science and Technology, 66 (1):10-16 2016.

Efficient generation of mouse induced pluripotent stem-like cells using a powerful CAG promoter, the *piggyBac* transposon, and a lipofection method

Takahiro KIKUCHI[1,*], Natsuki KUSUHARA[1,*], Asumi NONAKA[1], Yuki KUMAGAI[1], Misuzu HIRAIDE[1], Akira SASAKI[1, 2], Tomokazu FUKUDA[3] and Masayuki KOBAYASHI[1]

[1]Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Shimoshinjoh Nakano, Akita 010-0195, Japan

[2]Akita Research Institute of Food and Brewing, Araya, Akita 010-1623, Japan

[3]United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Ueda, Morioka 020-8551, Japan

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Masayuki KOBAYASHI

(Fax: +81 (0) 18-872-1676, E-mail: makoba@akita-pu.ac.jp)

Summary

In the present study, we established a convenient, non-vial generating system for mouse induced pluripotent stem (iPS)-like cells. As a first step, in order to efficiently introduce plasmid vectors to mouse fibroblasts, ViaFect was selected as the most efficient reagent from seven lipofection reagents. As a second step, we constructed an iPS cell-inducing vector combining Yamanaka factors, a powerful CAG promoter, and the non-viral *piggyBac* transposition system. This iPS cell-inducing vector was transfected using ViaFect into mouse embryonic fibroblast E6/E7-MEF cells in combination with a *piggyBac* transposase expression vector. Approximately 3 weeks after transfection, numerous aggregated (or compacted) cell colonies with strong alkaline phosphatase activity had been generated. In these colonies, NANOG, a representative iPS cell marker, was detected clearly. These phenotypes corresponded well with the features of mouse iPS cells. The efficiency of generating colonies with alkaline phosphatase activity was calculated as ~0.2%, which was similar to that using retrovirus vectors. From these results, we suggest that our generating system for iPS-like cells is applicable for screening of novel transcription factors and novel compounds derived from synthetic chemistry and natural products.

Key words: CAG promoter, fibroblast, iPS cells, lipofection, *piggyBac* transposon