

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14888

研究課題名(和文) イヌiPS細胞から共培養細胞表面灌流による血小板の効率的作製

研究課題名(英文) The effective method for generation of platelets from canine iPS cells by perfusion cocultivation

研究代表者

稲葉 俊夫 (INABA, TOSHIO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00137241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血小板減少症の治療に向けて、イヌiPS細胞から血小板への効率的な分化誘導技術の開発を目的に検討し、以下の成果を得た。3つのイヌ造血サイトカイン遺伝子を発現するフィーダー細胞を作製することができた。長期継代可能なイヌiPS細胞を作製したが、血小板へ分化誘導することができなかった。新規複能性幹細胞としてイヌ人工胚体外内胚葉細胞様細胞株を作製することができた。本細胞株を用いて血小板の作製を検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was in the development of the effective method for generation of platelets from canine iPS cells, and the following results were obtained. We generated canine hematopoietic cytokine-secreting feeder cells by transfection of the genes to OP9 cells. While we established a stable and long-term culture of canine iPS cells, we could not differentiate them into platelets. We generated new canine stem cell lines that closely resemble to extraembryonic endoderm cells. These cell lines will apply to platelet production.

研究分野：農学

キーワード：再生医療 統合動物科学 iPS細胞 血小板 バイオテクノロジー トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

血小板減少症は、ヒトと同様にイヌにおいてもよく見られる病態で、新鮮血小板の輸注以外に効果的な治療法はない。研究代表者らはイヌ iPS 細胞から血小板を作製することに世界で初めて成功している (Stem Cells Dev, 22, 2026-35, 2013)。しかしながら、生体内では1個の巨核球から2000個ほどの血小板が産生されると言われているが、ヒト iPS 細胞を用いた報告と同様に、イヌ iPS 細胞においても1個の細胞から数十個程度の血小板しか作製できていないのが現状である。iPS 細胞から血小板への効率的な分化誘導法を確立できれば、上記問題の解決に大きな前進をもたらす

2. 研究の目的

本研究では、イヌ iPS 細胞を用いて、造血系分化誘導サイトカイン遺伝子を導入したフィーダー細胞上で培養した後、血小板を効率的に作製することを試みる。本研究の成果は、iPS 細胞から他の血液系細胞への分化誘導にも応用可能で、また、ヒトの再生医療にも有用な情報を提供するものである。

3. 研究の方法

(1) イヌサイトカイン発現フィーダー細胞(株)の作製: イヌ造血サイトカイン(幹細胞(成長)因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO)およびエリスロポエチン(EPO))遺伝子を作製し、これらの遺伝子を piggyBac トランスポゾンベクターにより骨髄間質細胞由来フィーダー細胞の OP9 細胞に導入し、本 OP9 細胞株からの造血サイトカインの発現を調べた。

(2) ドキシサイクリンの有無により導入遺伝子の発現を操作することができるドキシサイクリン誘導性レンチウイルスベクターを用い、4つの多能性維持遺伝子(マウス *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc*)をイヌ胎子線維芽細胞に導入することで、血小板に効率的に分化誘導可能なイヌ iPS 細胞の作製を試みた。

(3) (2)と同様に薬剤誘導性ベクターを用いて多能性維持遺伝子導入を行い、マウスやヒトで iPS 細胞の作製効率を上げると報告されている低分子阻害剤を同時に添加し、イヌ iPS 細胞の作製を試みた。

4. 研究成果

(1) OP9 細胞の培養上清を ELISA 法にて分析することで、SCF のタンパク質発現が確認された。しかしながら、TPO および EPO のタンパク質発現は検出できなかった。イヌ TPO や EPO に対する ELISA キットの検出感度が低い可能性が考えられたので、培養上清を濃縮し、ウエスタンブロッティングにて TPO および EPO のタンパク質発現を確認したところ、

TPO と EPO の両方において目的バンドが得られた(図1)。本結果より、イヌ造血サイトカインを発現する OP9 細胞株が得られた。iPS 細胞から血球系細胞を分化誘導するには、造血サイトカインが必須であることから、今後、本細胞株を用いたイヌ iPS 細胞の効率的な分化誘導法の確立が望まれる。

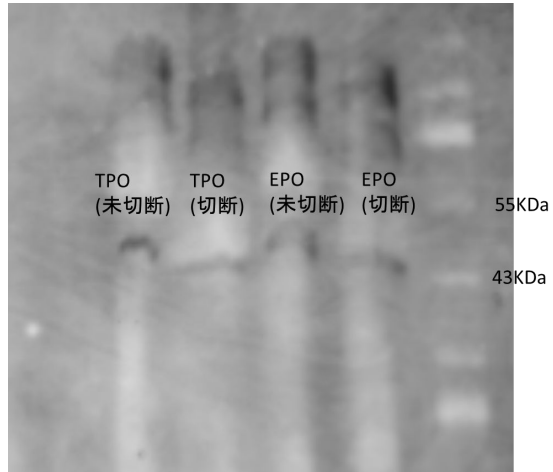


図1. イヌ TPO、EPO 遺伝子導入 OP9 細胞におけるタンパク質の発現
OP9 細胞の培養上清を濃縮・精製後、糖鎖修飾を切断し、ウエスタンブロッティングした。

(2) 薬剤誘導性ベクターを用いて長期継代可能なイヌ iPS 細胞を作製した。本細胞は、未分化マーカーを発現しており(図2)、三胚葉への分化能を有していた(図3)。また、無血清・無フィーダー細胞条件下で培養維持できた(図4)。

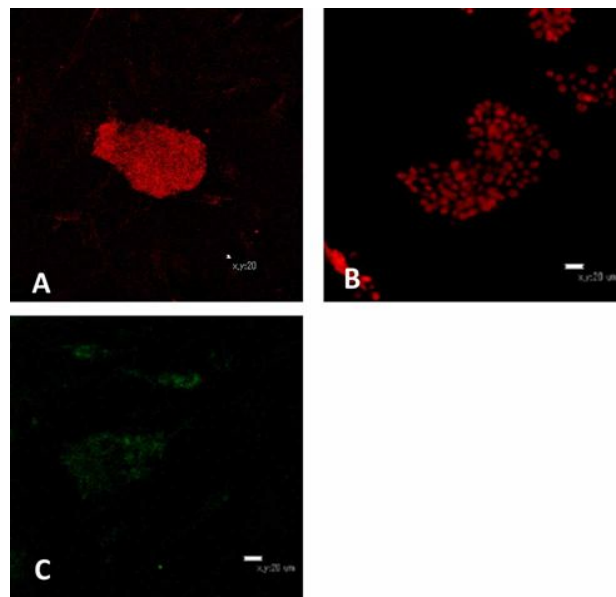


図2. イヌ iPS 細胞の免疫染色
A: NANOG、B: OCT3/4、C: Stage Specific Embryonic Antigen4(SSEA4)

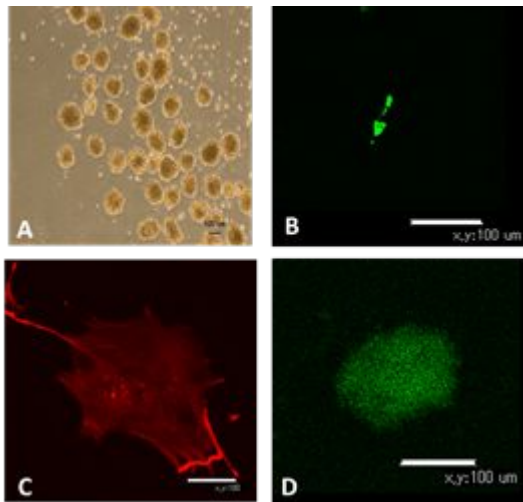


図 3 . イヌ iPS 細胞を浮遊培養することで得られた胚様体と胚様体を接着培養することで得られた細胞の免疫染色
A: 胚様体、B: α -TUBULIN (外胚葉)、
C: DESMIN (中胚葉)、D: SOX17 (内胚葉)

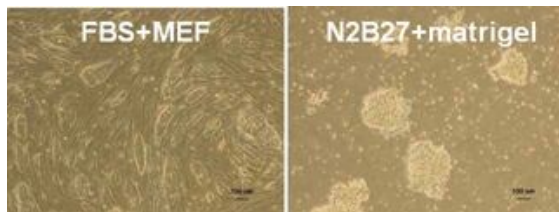


図 4 . 血清/フィーダー細胞および無血清/無フィーダー細胞条件下で培養したイヌ iPS 細胞
FBS+MEF: 血清/フィーダー細胞条件、
N2B27+matrigel: 無血清/無フィーダー細胞条件

作製したイヌ iPS 細胞を前述の造血サイトカイン産生 OP9 細胞と共培養し、イヌ iPS-sac を介した手法を用いることで、血小板への効率的な分化誘導を試みた結果、イヌ iPS-sac は得られず、血小板への分化誘導はできなかった。

このイヌ iPS 細胞の特性を詳しく解析したところ、本細胞株は、白血病阻害因子 (LIF) が培養に必須である既存のイヌ iPS 細胞とは異なり、LIF 非存在下で培養可能であることが確認された。また、その未分化状態がどのシグナル経路によって維持されているかを調べるために、LIF/Stat3 シグナル阻害因子 (JAKi) と Erk1/2 シグナル阻害因子 (MEKi) を培地に添加し、量的 RT-PCR にて多能性維持遺伝子の発現を調べた。その結果、JAKi では発現に影響はみられなかったのに対し、MEKi では発現が低下したことから (図 5)、本 iPS 細胞は Erk1/2 シグナルにてその未分化状態を長期に維持している着床後後期胚盤胞期胚から得られるエピプラストの特性を有する細胞と考えられた。

これらの結果から、既存の報告とは異なる新規の長期継代可能なイヌ iPS 細胞を作製することに成功した。

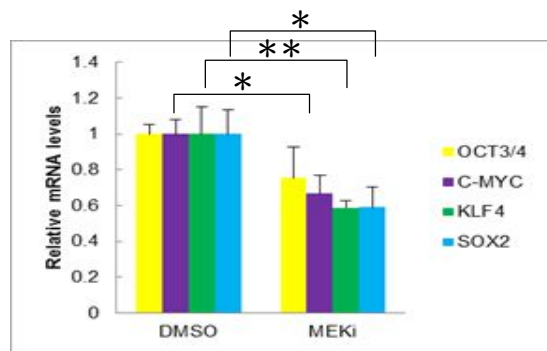
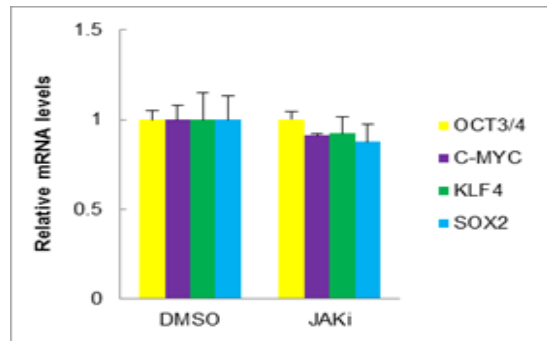


図 5 . 阻害因子の添加による多能性維持遺伝子 *OCT3/4*, *C-MYC*, *KLF4*, *SOX2* の発現
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(3) 薬剤誘導性ベクターを用いて 4 つの多能性維持遺伝子を導入したイヌ体細胞を、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) 1 阻害剤、p38 マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ阻害剤などの低分子化合物の存在下で培養し、イヌ iPS 細胞の作製を試みた結果、培養 5 日からドーム型の細胞コロニーがいくつか出現し (図 6A)、この細胞コロニーを数回継代することで辺縁からタイル状の扁平な細胞コロニーが出現した (図 6B)。得られた細胞コロニーは 50 継代以上培養可能であった (図 6C)。また、コロニーを形成する一部の細胞はアルカリフォスファターゼ (AP) 染色に陽性を示した (図 6D)。

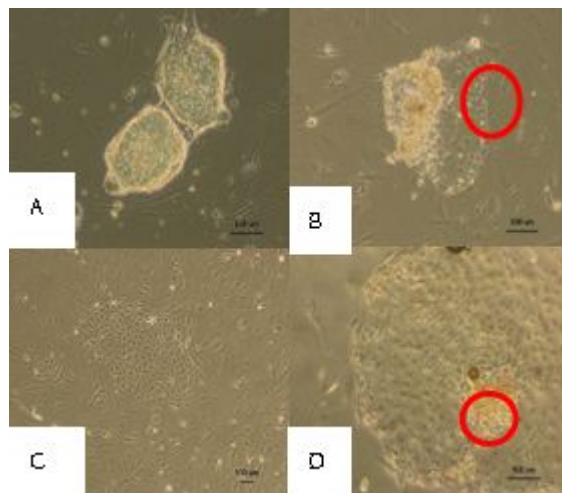


図 6 . 細胞コロニー
A: 初代細胞コロニー、B: 4 継代の細胞コロニー、
C: 58 継代の細胞コロニー、D: AP 染色

得られた細胞株は量的 RT-PCR にて多能性維持遺伝子である *OCT3/4* および *NANOG* の発現は確認されず、胚体外内胚葉 (XEN) マーカーである *GATA4*, *GATA6*, 近位内胚葉マーカーである *AFP*, 遠位内胚葉マーカーである *TPA* および胚体内内胚葉マーカーである *FOXA2* を発現していた。また外因性遺伝子の発現がサイレンシングされていることが確認された。

これらの結果から、イヌ体細胞から人工的に胚体外内胚葉細胞様細胞株 (iXEN 様細胞株) を作製することに成功した。

本細胞株を OP9 細胞上で培養し血球系細胞への分化誘導を行ったところ、培養上清中に浮遊細胞が確認され、フローサイトメリーにて白血球マーカーである CD45 抗原陽性細胞が確認された (図 7)。

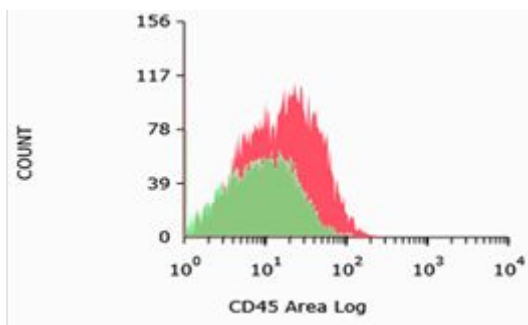


図 7. iXEN 様細胞株より分化誘導した CD45 陽性細胞 (赤)、コントロール (緑)

さらに、分化誘導した接着細胞を AP 染色したところ多数の大型多核の細胞が陽性を示した。また、陰性を示した細胞も存在し、立体的管様構造を形成する細胞であった (図 8)。

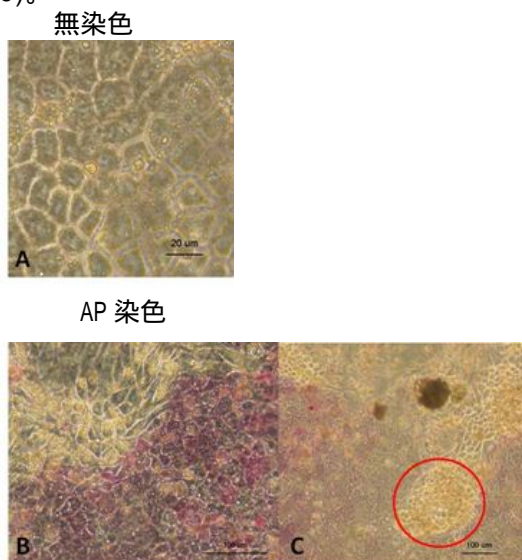


図 8. OP9 細胞共培養後分化細胞の顕微鏡写真
A: 多核かつ多角形状細胞、B: AP 染色陽性細胞、C: AP 染色陰性細胞

また、多核かつ多角形状の細胞は、肝細胞特異的なマーカーであるアルブミンタンパ

クを発現しており、さらに、成熟肝細胞マーカーであるシトクロム P450 酵素の一種である *CYP3A4* 遺伝子を発現していた (図 9)。

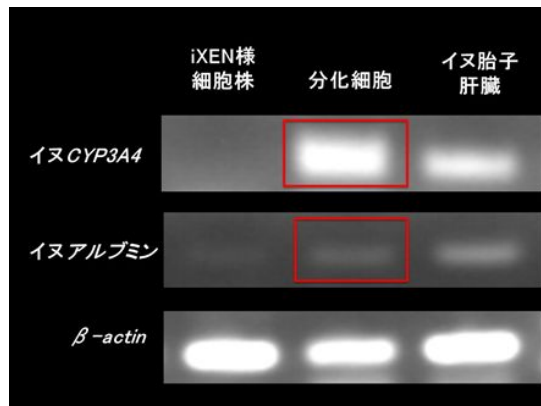


図 9. 分化細胞の成熟肝細胞マーカーの発現

立体的管様構造を形成する細胞は、三次元管様構造を形成し、毛細胆管膜マーカーである *MRP2* タンパクを発現する細胞も確認された (図 10)。

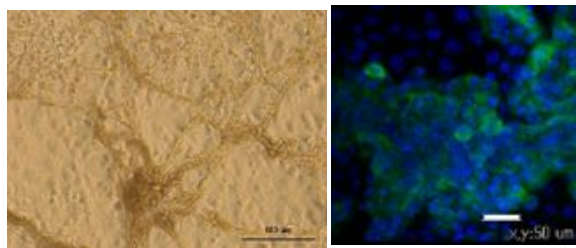


図 10. 分化細胞の毛細胆管膜マーカー (*MRP2*) の発現 左図: 三次元管様構造 右図: 緑 *MRP2*、青 DAPI

これらのことから、イヌ iXEN 様細胞株は胚体内内胚葉系細胞への分化能を有しており、OP9 細胞上で分化誘導することで、肝細胞や胆管上皮細胞で構成された肝組織類似構造を形成することが明らかとなった。これまで、XEN 細胞の胚体内組織への分化能や、肝細胞や胆管上皮細胞への分化誘導の報告はない。本知見は、いままで明らかでなかった XEN 細胞の新たな性質を提示するとともに、ヒト疾患モデルの作製など獣医再生医療だけでなくヒト医療においても応用可能であると考えられる。

今後、iXEN 様細胞株と前述のイヌ造血サイトカイン産生 OP9 細胞との共培養による血小板の大量培養に繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Nishimura T, Unezaki N, Kanegi R, Wijesekera DPH, Hatoya S, Sugiura K, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T. Generation of canine induced

extraembryonic endoderm-like cell line that forms both extraembryonic and embryonic endoderm derivatives. *Stem Cells and Development*, 査読有、2017、印刷中

DOI: 10.1089/scd.2017.0026

Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Wijesekera DPH, Sanno K, Tanaka E, Sugiura K, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T. Feeder-independent canine induced pluripotent stem cells maintained under serum-free conditions. *Molecular Reproduction and Development*, 査読有、84巻、2017、329-339

DOI: 10.1002/mrd.22789

Koyama Y, Ito T, Hasegawa A, Eriguchi M, Inaba T, Ushigusa T, Sugiura K. Exosomes derived from tumor cells genetically modified to express Mycobacterium tuberculosis antigen: a novel vaccine for cancer therapy. *Biotechnology Letters*, 査読有、38巻、2016、1857-1866

DOI: 10.1007/s10529-016-2185-1

Nishida H, Tanaka H, Kitamura M, Inaba T, Nakayama M. Methylprednisolone sodium succinate reduces spinal cord swelling, but has no effect of recovery in dogs with surgically treated intervertebral disc herniation. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 査読有、64巻、2016、191-196

DOI: 10.14943/jjvr.64.3.191

Kanegi R, Hatoya S, Tsujimoto Y, Takenaka S, T. Nishimura T, Wijewardana V, Sugiura K, Takahashi M, Kawate N, Tamada H, Inaba T. Production of feline leukemia inhibitory factor (LIF) with biological activity in *Escherichia coli*. *Theriogenology*, 査読有、86巻、2016、604-611

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.013

稲葉俊夫、ヒト再生医療の実現に向けたイヌ iPS 細胞の創製、ケミカルエンジニアリング、61巻、2016、119-125

Koyama Y, Sugiura K, Yoshihara C, Inaba T, Ito T. Highly effective non-viral antitumor gene therapy system comprised of biocompatible small plasmid complex particles consisting of pDNA/Polyethylenimine "Max" /anionic polysaccharide ternary complexes. *Pharmaceutics*, 査読有、7巻、2015、152-164
DOI: 10.3390/pharmaceutics7030152

Wijewardana V, Sugiura K, Wijesekera DP, Hatoya S, Nishimura T, Kanegi R, Ushigusa T, Inaba T. Effect of ovarian hormones on maturation of dendritic cells from peripheral blood monocytes in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*,

査読有、77巻、2015、771-775

DOI: org/10.1292/jvms.14-0558

〔学会発表〕(計16件)

Koyama Y, Ito T, Inaba T, Sugiura K "Artificial neopeptide"-bearing exosomes as novel vaccine for cancer immunotherapy 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5日~2016年12月7日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

畦崎直哉、西村俊哉、金城綾二、Daluthgamage Patsy Himali Wijesekera、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、川手憲俊、玉田尋通、今井裕、稲葉俊夫 イヌ体細胞を用いた人工誘導胚体外内胚葉細胞の作製と肝細胞への分化誘導 第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月6日~2016年9月8日 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

篠原健志、太田祥弘、川手憲俊、高橋正弘、坂上信忠、稲葉俊夫、玉田尋通 ウン卵子の体外成熟培養時における MAPKK 阻害剤(U0126)添加の胚発生に及ぼす影響 第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月6日~2016年9月8日 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

沖田良太、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、大高真奈美、西村健、中西真人、稲葉俊夫 ネコ iPS 細胞株のセンダイウイルスベクターを用いた作製 第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月6日~2016年9月8日 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

長谷川綾、牛草貴博、小山義之、伊藤智子、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、稲葉俊夫 結核菌抗原遺伝子を用いた腫瘍治療メカニズムの解明 第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月6日~2016年9月8日 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

小山義之、伊藤智子、長谷川綾、杉浦喜久弥、稲葉俊夫、江里口正純 「人工ネオエビトープ」を担持した腫瘍由来エクソソームによるガン免疫治療 第3回日本細胞外小胞学会 2016年8月31日~日~2016年9月2日 グランドプリンスホテル広島(広島県広島市)

Wijesekera D.P.H., Sugiura K, Ichida C, Yuba E, Kono K, Yamate J, Kanegi R, Nishimura T, Nadeeka H.D., Hatoya S, Inaba T. Manipulation of tumor microenvironment by cytokine gene transfection enhances dendritic cell-based immunotherapy. ICI 2016-International Congress of Immunology 2016(国際学会) 2016年8月21日~2016年8月26日 Melbourne Convention and Exhibition Centre (Melbourne, Australia)

Kawate N, Hannan MA, Fukami Y, Weerakoon WWPN, Bullesbach EE, Inaba T, Tamada H. Effects of long-acting GnRH antagonist on plasma insulin-like peptide 3 and testosterone concentrations and scrotal circumference in male goats. 18th

International Congress of Animal Reproduction (国際学会) 2016年6月26日~2016年6月30日、Tours (France)

Unezaki N, Nishimura T, Kanegi R, Wijesekera D.P.H., Hatoya S, Sugiura K, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T. Generation of multipotent canine extraembryonic endoderm-like cells via the formation of induced pluripotent stem cells. The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 14th Annual Meeting (国際学会) 2016年6月22日~2016年6月25日. Moscone West (San Francisco, USA)

Koyama Y, Ito T, Eriguchi M, Hasegawa A, Inaba T, Sugiura K. "Artificial neoepitope"- bearing exosomes derived from tumor cells being genetically modified to express Mycobacterium tuberculosis antigen: a novel vaccine for cancer therapy. The 5th Annual Meeting of the International Society for Extracellular Vesicles (国際学会) 2016年5月4日~2016年5月7日 De Doelen Concert and Congress Center (Rotterdam, Netherlands)

西村俊哉、田中恵里菜、鳩谷晋吾、金城綾二、Wijesekera, DPH、杉浦喜久弥、玉田尋通、川手憲俊、今井 裕、稲葉俊夫、イヌiPS細胞のマトリゲル上での培養と間葉系幹細胞への分化誘導、第15回日本再生医療学会総会、2016年3月17日~2016年3月19日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

Wijesekera DPH, Sugiura K, Hatoya S, Inaba T. Enhancement of anti-tumor immune response by transfection of IFN gene into tumor using novel type synthetic vectors. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18日~2015年11月20日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

市田千尋、杉浦喜久弥、Wijesekera DPH、弓場英司、鳩谷晋吾、河野健司、稲葉俊夫、サイトカイン遺伝子治療と樹状細胞療法の併用によるがん免疫治療、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月7日~2015年9月9日、北里大学(青森県十和田市)

辻本恭典、鳩谷晋吾、金子武人、杉浦喜久弥、稲葉俊夫、ネコの未成熟精子およびフリーズドライ精子による顕微授精、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月7日~2015年9月9日、北里大学(青森県十和田市)

高橋正弘、本田龍駿、鳩谷晋吾、稲葉俊夫、川手憲俊、玉田尋通、成熟培養時の機械的振動によるウシ胚発生率の向上、第22回日本胚移植研究会、2015年8月27日~2015年8月28日、高知大学(高知県南国市)

Nishimura T, Kanegi R, Wijesekera, DPH, Sanno K, Tanaka E, Sugiura K, Hatoya S, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T. Feeder-independent and serum-free canine

induced pluripotent stem cells reprogrammed by a drug-inducible system. The International Society for Stem Cell Research 13th Annual Meeting (国際学会) 2015年6月24日~2015年6月27日、Stockholmsmassan Exhibition and Convention Center (Stockholm, Sweden)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: イヌ人工誘導胚体外内胚葉細胞様株の作製方法

発明者: 稲葉俊夫、西村俊哉、畦崎直哉、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥

権利者: 公立大学法人大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特許願 2016-116612 号

出願年月日: 平成28年6月10日

国内外の別: 国内

名称: イヌiPS細胞の製造方法

発明者: 稲葉俊夫、西村俊哉、田中恵里菜、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥

権利者: 公立大学法人大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特許願 2015-123775 号

出願年月日: 平成27年6月19日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/english/cell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 俊夫 (INABA, Toshio)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 00137241

(2) 研究分担者

杉浦 喜久弥 (SHUGIURA, Kikuya)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 30171143

鳩谷 晋吾 (HATOYA, Shingo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 40453138