

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14974

研究課題名（和文）ネコiPS細胞による新たな2型糖尿病治療法の開発

研究課題名（英文）development of a new treatment for type 2 diabetes mellitus using feline iPS cells

研究代表者

金城 綾二（Kanegi, Ryoji）

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・特任講師

研究者番号：00827941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではネコ体細胞から人工多能性幹細胞（iPS細胞）の作製を行った。その際、これまでに指摘されている腫瘍化や細胞の分化阻害（目的とする細胞へ変化しない）の危険性を抑えるため、iPS細胞を作製する方法や培養液に改良を加えた。その結果、iPS細胞としての特性（無限に増殖する自己増殖能および様々な細胞へ変化できる多分化能）を有したまま、腫瘍化や分化阻害の危険性が低いネコiPS細胞を作製することに成功した。

また、作製したネコiPS細胞の培養条件を変更することにより、インスリン産生細胞へと変化する可能性のある細胞（胚体内胚葉細胞）の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、研究の先行するヒトやマウスと同様の特性を有するネコiPS細胞の作製に成功した。また、作製方法や培養液に改良を加えることにより、腫瘍化や細胞の分化阻害の危険性のないネコiPS細胞の培養条件を明らかにした。これらは、ヒトやマウスと同様、ネコにおける再生医療の可能性を示した研究成果であると考えられる。

また、上記研究で作製したネコiPS細胞を使用し、特定の細胞への分化誘導に成功した。今後、さらに分化誘導を重ねることにより、将来的にはインスリン産生細胞を作製し、ネコの糖尿病の根本的治療方法を開発できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, induced pluripotent stem cells (iPS cells) were generated from feline somatic cells. In order to minimize the risk of tumorigenesis and cell differentiation inhibition (failure to transform into target cells), which have been pointed out in the past, we improved the method of iPS cell production and the culture medium. As a result, we succeeded in producing feline iPS cells with low risk of tumorigenesis and differentiation inhibition while maintaining the characteristics of iPS cells (i.e., self-proliferative ability for unlimited growth and pluripotency to change into various types of cells).

Furthermore, by changing the culture conditions of the generated feline iPS cells, they succeeded in transforming them into cells (embryonic endoderm cells) with the potential to transform into insulin-producing cells in the future.

研究分野：再生医療、獣医学、内科学、神経病学

キーワード：iPS細胞 再生医療 ネコ インスリン産生細胞 胚体内胚葉 フィーダーフリー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

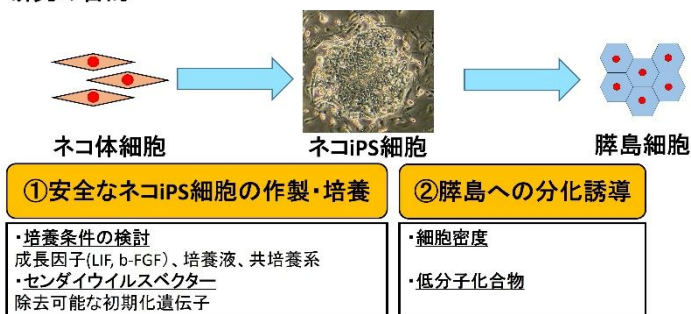
ヒト医療では臓器移植による難治性疾患の治療が行われている。また、移植用臓器の不足に対し、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が応用され始めている。一方、獣医療では飼育頭数の増加や飼育環境の変化により、ネコの診療が増加しているが、その中でも肥満に伴う 2 型糖尿病は生涯に渡る治療が必要であり、飼い主の負担となっている。ネコにおいても iPS 細胞による糖尿病治療法の開発が望まれるが、iPS 細胞由来膵島の作製は報告されていない。また、これまでに作製されたネコ iPS 細胞はゲノム遺伝子の改変による腫瘍化の危険など、臨床応用への課題は多い。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、腫瘍化の危険性がなく、高い増殖能と分化能を有するネコ iPS 細胞を作製し、生体への移植後も長期に渡って血糖コントロールが可能な膵島の作製およびその移植法を確立することにより、生涯に渡る治療が必要とされるネコの 2 型糖尿病の根治的な治療法を開発することである。

その前段階として、ゲノム遺伝子の改変が生じないセンダイウイルスベクターを使用したネコ iPS 細胞の作製、およびネコ iPS 細胞の膵島への分化誘導法の確立を行う。

研究の目的



3. 研究の方法

(1)ネコ iPS 細胞の培養条件の検討

申請者はこれまでの研究において、培養液に成長因子として塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を添加し、ネコ iPS 様細胞を作製している。一方、成長因子として白血病抑制因子 (LIF) を使用したネコ iPS 様細胞の作製が報告されている。これらの細胞株は異なる特徴を有しており、ネコ iPS 細胞が要求する成長因子は明らかにされていなかった。本研究では申請者が作製したネコ iPS 様細胞の培地として (A)bFGF 添加群、(B)bFGF + DMSO 添加群、(C)b-FGF 無添加群、(D)bFGF + LIF 阻害剤を使用し、ネコ iPS 様細胞の培養維持が可能か検討した。

(2)ゲノム遺伝子の改変を伴わないネコ iPS 細胞の作製・培養方法の確立

本研究では、宿主ゲノムを傷害せず、初期化遺伝子が導入可能なセンダイウイルスベクターを用いてネコ iPS 細胞を試みた。その際、イヌ iPS 細胞で新たに報告された培養条件を参考とし、(1)で検討した培養条件に改良を加えた。得られたネコ iPS 細胞は未分化マーカー (OCT, NANOG) の発現、in vitro および in vivo での三胚葉分化 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) を免疫染色および RT-PCR で評価した。また、長期培養時に染色体数の異常が生じ、腫瘍化の危険性がないかを確かめるため、核型解析を行った。

(3)共培養系に依存しないネコ iPS 細胞の培養条件の検討

(1)および(2)におけるネコ iPS 細胞の作製・維持において、他種の細胞と共培養する手法 (共培養系) を使用してきた。共培養系は iPS 細胞の培養・維持に必要な様々な成長因子や細胞外基質の分泌、細胞間接着シグナルの発生などの多くの利点があり、iPS 細胞の培養時に多く使用されてきた。一方、iPS 細胞の分化誘導を行う際には、細胞分化には不要な成長因子や細胞外基質の分泌、細胞間接着シグナルの発生が生じてしまう。その結果、不十分な分化誘導や意図しない細胞種への分化誘導が生じるなどの欠点が考えられた。そこで、本研究では他種の細胞との共培養を必要としない、ネコ iPS 細胞の培養条件について検討を行った。

(4)精巢線維芽細胞からのネコ iPS 細胞の作製

これまでの研究において作製したネコ iPS 細胞は、ネコの胎子線維芽細胞、皮膚線維芽細胞、血液細胞などに初期化遺伝子を導入することにより作製してきた。しかしながら、これらの細胞を採取するには、発育途中のネコ胎子の検体確保、または皮膚の切除や採血などを必要とし、ネコに本来は不要な負担を強いる必要があった。一方、獣医療ではネコの不妊化を目的とし、去勢

手術が広く実施されている。本研究ではこの去勢手術に着目し、去勢手術で得られた精巣から線維芽細胞を採取することにより、ネコに不要な負担をかけないネコ iPS 細胞の作製を試みた。また、ネコ iPS 細胞作製の際には(1)-(3)の研究成果である、センダイウイルスベクターによる初期化遺伝子の導入、ならびに共培養系を使用しない培養条件を使用した。

(5)ネコ iPS 細胞の臍島への分化誘導法の検討 (胚体内胚葉への誘導)

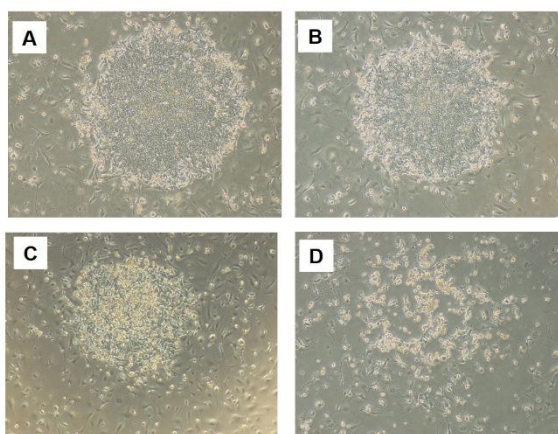
生体における臍島への発生では様々な段階を有することが知られている。ヒトやマウス iPS 細胞を用いた研究では、初期内胚葉の分化に重要な成長因子 (Activin A, EGF, IGF1 など) を培養液に添加し、臍島への分化誘導が行われてきた。しかしながら、臍島への分化効率は高くはなく、各発生段階における分化誘導法の改善が必要とされている。申請者は、ネコ iPS 細胞の臍島分化誘導法確立の第一段階として、ネコ iPS 細胞からの胚体内胚葉への分化誘導法を検討した。その際、細胞間接着や細胞外基質などの相互作用についても着目し、分化誘導時の細胞播種密度、および誘導培地中の低分子化合物の添加について検討した。

4. 研究成果

(1)ネコ iPS 細胞の培養条件の検討

申請者が作製したネコ iPS 様細胞の培養条件を変更したところ、(A)bFGF 添加群および(B)bFGF + DMSO 添加群では長期培養が可能であったが、(C)b-FGF 無添加群および(D)bFGF + LIF 阻害剤では培養維持が困難であった。そのため、申請者が作製したネコ iPS 様細胞は bFGF の要求性が高いものの、LIF を介した成長刺激を要することが明らかとなった。本研究は同一のネコ iPS 様細胞株に対して、成長因子の要求性について初めて検討し、その結果として b-FGF と LIF の双方がネコ iPS 様細胞の作製・培養維持に重要であることを明らかにした。今後、本研究成果を参考にネコ iPS 細胞の作製条件を改良することが可能と考えられた。

研究(1)



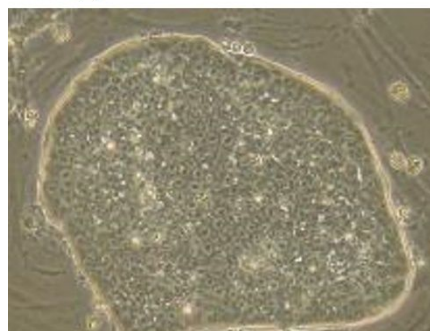
(2)ゲノム遺伝子の改変を伴わないネコ iPS 細胞の作製・培養方法の確立

センダイウイルスベクターを用いて作製したネコ iPS 細胞は長期培養が可能であり、未分化マーカー(OCT, NANOG)の発現、in vitro および in vivo での三胚葉分化 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) などの幹細胞特性を有していた。また、長期培養後も染色体数の異常が生じず、iPS 細胞の作製時に導入した初期化遺伝子も除去されていた。本結果から、幹細胞の特性を有しながらも、腫瘍化の危険性を伴わないネコ iPS 細胞の作製に成功したと考える。これまでにヒトやマウスと同レベルの幹細胞特性を有するネコ iPS 細胞の作製報告はなく、ネコにおいても十分な幹細胞特性を有するネコ iPS 細胞が作製可能であることを明らかにした。本研究成果は今後、作製したネコ iPS 細胞の臨床応用の可能性を示したと考えられた。

(3)共培養系に依存しないネコ iPS 細胞の培養条件の検討

ヒト iPS 細胞を対象として新たに作製された幹細胞培地および細胞外基質を使用することにより、共培養系で作製したネコ iPS 細胞であっても、ネコ iPS 単独での維持が可能であった。今後、本培養条件を活用することにより、不確定・不安定な要素を除外した条件下において、ネコ iPS 細胞の分化誘導について検討することが可能になったと考えられた。

研究(3)

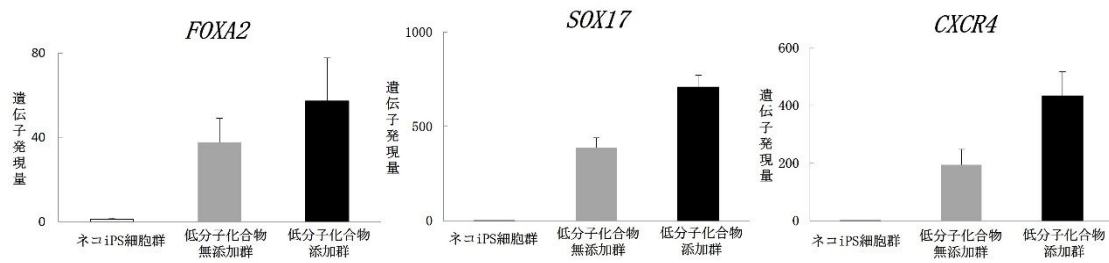


(4)精巣線維芽細胞からのネコ iPS 細胞の作製

去勢手術により得られたネコの精巣を破碎・酵素処理することにより、形態的特徴から線維芽細胞と思われる細胞群を採取することに成功した。また、本細胞群を使用して作製したネコ iPS 細胞は未分化マーカー(OCT, NANOG)を発現し、長期の維持培養が可能であった。iPS 細胞の作製時に導入した初期化遺伝子も除去されており、腫瘍化の危険性を伴わないと考えられた。本研究成果は、ネコ iPS 細胞の作製に使用する細胞資源について新たな可能性を示し、今後は動物愛護などの倫理的問題を解決可能な手法と考えられた。

(5)ネコ iPS 細胞の臍島への分化誘導法の検討、得られた臍島の機能解析

ネコ iPS 細胞からの胚体内胚葉への分化誘導において、低い細胞密度では細胞増殖が乏しく、分化誘導に十分な細胞数を得ることが困難であると考えられた。一方、高い細胞密度では胚体内胚葉への形態変化に乏しく、iPS 細胞の相互作用により分化誘導の阻害が生じていると考えられた。また、ヒト iPS 細胞を参考に低分子化合物の添加について検討を行ったところ、無添加群と比較して添加群では胚体内胚葉マーカー（FOXA2、SOX17、CXCR4）の発現率が高くなることが明らかとなった。本研究成果はネコ iPS 細胞の膵島分化誘導の第一段階である、胚体内胚葉への分化誘導に適した条件を明らかとし、今後の分化誘導研究を進展させるものと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 KANEGI Ryoji, HATOYA Shingo, KIMURA Kazuto, YODOE Kyohei, NISHIMURA Toshiya, SUGIURA Kikuya, KAWATE Noritoshi, INABA Toshio	4. 巻 69
2. 論文標題 Generation, characterization, and differentiation of induced pluripotent stem-like cells in the domestic cat	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 317 ~ 327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2022-038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞病態学教室ホームページ http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/cell/ Laboratory of Cell Pathology http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/english/cell/

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------