

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658101

研究課題名（和文） イヌ iPS 細胞による脊髄損傷の治療に向けた基盤技術の開発

研究課題名（英文） Development of cell therapy using induced pluripotent stem cells for dogs with spinal cord injury

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

研究成果の概要（和文）：イヌの人工多能性幹細胞（iPS 細胞）による脊髄損傷イヌの治療に向けた基盤技術の開発を目的に検討し、以下の成果を得た。①イヌ胎子線維芽細胞に4つの転写因子をレンチウイルスベクターによって導入することにより、マウス ES 細胞に類似した形態の、25 代以上安定して継代できる多能性細胞株を作製することができた。②本細胞から選択的に神経細胞へ分化誘導できた。③骨髄間質細胞を代用した脊髄損傷イヌの細胞治療により、その安全性と有効性を評価したが、iPS 細胞の利用についてはさらに検討が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to development of cell therapy using induced pluripotent stem (iPS) cells for dogs with spinal cord injury, and the following results were obtained. ① We successfully reprogrammed canine embryonic fibroblasts into iPS-like cells using lentiviruses containing 4 transcription factors. Canine iPS-like cell colonies displayed a mouse embryonic stem (ES) cell-like morphology, differentiated to multiple cell types *in vitro*, and maintained their proliferation and mouse ES-like morphology beyond passage 25. ② Neurons could be induced from canine iPS-like cells. ③ Bone marrow stromal cell transplantation caused no complications and could have beneficial effects on functional recovery of dogs with spinal cord injury, and further studies are required to apply iPS-like cells for the treatment of these dogs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,400,000 | 0 | 2,400,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 240,000 | 3,440,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 臨床獣医学

キーワード：獣医学、トランスレーショナルリサーチ、バイオテクノロジー、移植・再生医療、発生・分化、iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は交通事故、スポーツ、椎間板ヘルニアなどによって発生する。損傷部位によって症状は異なるが、重度の場合は排尿・排

便障害、四肢（後躯）麻痺など永続的にその機能が障害される。現在、日本には10万人以上の脊髄損傷患者が存在しており、毎年5,000人以上が新たに発生している。獣医学

領域においても、近年、ミニチュアダックスフントなどの犬種の飼育の増加に伴い、椎間板ヘルニアによる脊髄損傷の症例が増加傾向にある。現在、確立している治療法は、脊髄の減圧および脊椎の固定術と術後のリハビリテーションであるが、機能の回復が困難な場合は寝たきり、または、車椅子での生活を余儀なくされる。

最近、山中らによって多能性幹細胞に特異的に発現する4つの遺伝子を体細胞に導入することによってヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) が樹立された。本 iPS 細胞の作製技術は効率は低いものの、目的とする遺伝子を組み込むことにより多能性幹細胞株を樹立できる点で画期的であり、ヒト再生医療への応用が期待されている。しかしながら、ヒトの再生医療における iPS 細胞の有効性や安全性については未知のものが多く、実際の医療応用に際しては慎重なトランスレーショナル・リサーチが必要となる。そのために、多くのグループがヒトにおける再生医療を目指し、そのモデルとしてマウスやラットに特化して研究を行なっている。しかし、それを再生医学領域で活用するためには、マウスやラットに限らず、ヒトに近い大型の動物で安全性モデル実験を行う必要がある。一方、ヒト以外の伴侶動物においても、再生医療への期待が大きい。

本研究は、ヒトと共通の脊髄疾患、生活習慣病、老齢化による疾病などが自然発症するイヌに着目し、イヌの iPS 細胞を作製し、本細胞を用いた再生獣医学研究を推進するもので、伴侶動物の再生医療というこれまでにない全く新規の試みといえる。さらに、げっ歯類よりも大型で、寿命の長いイヌの研究データは、特に長期的な経過を必要とする腫瘍化や期待しない組織への分化などの副作用を継時的に確認することによって、iPS 細胞治療のヒト臨床応用への有効性を検討するための信頼性の高い情報を提供できるものとする。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト再生医療の実用化を円滑に進め得るトランスレーショナルリサーチの1つとして、ヒトと同様な生活習慣病や老齢化による疾病の自然発症がみられるイヌに着目し、イヌの人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を効率的に樹立する技術を開発し、脊髄損傷イヌの治療へ応用することを目的に、以下の3項目について検討した。1) イヌ iPS 細胞の効率的・安定的樹立技術の開発 2) iPS 細胞から神経幹細胞への分化誘導 3) 骨髄間質細胞を代用した脊髄損傷イヌの治療

3. 研究の方法

(1) イヌ iPS 細胞株の樹立

イヌ胎子線維芽細胞に、マウスやヒトで使われている4つの多能性関連転写因子遺伝子 (Oct4、Sox2、Klf4 および c-Myc) をウイルスベクターを用いて導入し、イヌ iPS 細胞株の樹立を行った。作製細胞は、未分化細胞に特異的なマーカー遺伝子 (*Nanog*, *Oct-3/4*, *Sox-2*, *Klf4* など) やマーカータンパク質 (SSEA-1、SSEA-3、アルカリフォスファターゼ、NANOG、OCT-3/4 など) を用いて未分化性を評価するとともに、胚様体形成による三胚様性の細胞分化能などの多能性分化能について検討した。

(2) iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導の検討

①イヌ iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導する予備実験として、既に樹立されている胚性幹細胞 (ES 細胞) 株を用いて検討した。すなわち、ラット胎子由来初代培養アストロサイトの培養上清を用いて、カニクイザル ES 細胞から神経幹細胞への分化誘導を行った。得られた細胞は B27 Supplement 添加 Neurobasal Medium (B27 培地) 中で接着培養を行い、細胞増殖させた。増殖した細胞をアストロサイト培養上清または B27 培地にインスリン様成長因子 I (IGF-I) を添加した培地で接着培養することで神経系細胞へ分化誘導させた。神経幹細胞、幼若神経細胞、およびアストロサイトの関連マーカーを調べた。②ES 細胞株を用いた予備実験結果を踏まえて、iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導を行った。増殖した細胞について、神経幹細胞および幼若神経細胞マーカーを調べた。

(3) 骨髄間質細胞を利用した脊髄損傷イヌの治療

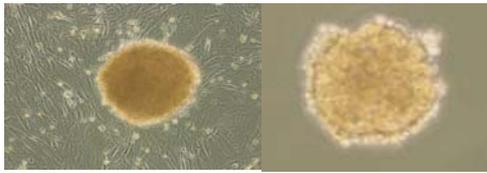
骨髄間質細胞は骨髄間葉系幹細胞を含む細胞群で、骨、脂肪、軟骨、および神経など多分化能を有している。イヌ iPS 細胞を利用した治療の予備実験として、iPS 細胞と同様な拒絶反応の問題点を克服できる自己の骨髄間質細胞を用いて検討した。すなわち、自己の骨髄間質細胞を脊髄損傷イヌに応用し、運動機能の検査で治療効果および腫瘍形成の有無を検討した。運動機能については、歩様をビデオにより撮影し、イヌにおける運動機能の評価法 (TSCIS, Olby et al., Am. J. Vet. Res. 2001, 62: 1624-1628) を用いて機能の回復を調べた。

4. 研究成果

(1) イヌ iPS 細胞株の樹立

①イヌ胎子線維芽細胞に4つの多能性関連転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4 および c-Myc)、さらに、多能性選抜マーカーとして EOS レポーターをレトロウイルスベクターを用いて導入した。両遺伝子導入から2週間後、出現した EOS-GFP を発現するコロニーをフィーダー細胞上に継代した。これらのコロニーは、

継代後もマウス ES 細胞様の形態を維持し、トリプシン処理で継代可能であった。また、多能性遺伝子の発現を RT-PCR で、多能性関連タンパク質の発現を免疫染色によって検討した結果、内因性のイヌ OCT3/4 や NANOG などの発現、および体細胞マーカーである THY1 の発現の減少が見られた。一方、得られたコロニーを丸底のディッシュを用いて 5 日間浮遊培養すると胚様体を形成し、様々な細胞に分化することが確認された。しかし、コロニーの安定的な継代培養はできなかった。②イヌ胎子線維芽細胞にレンチウイルスベクターを用いて上記の 4 つの多能性関連転写遺伝子を導入することで、iPS 様細胞コロニーを得た (図 1)。

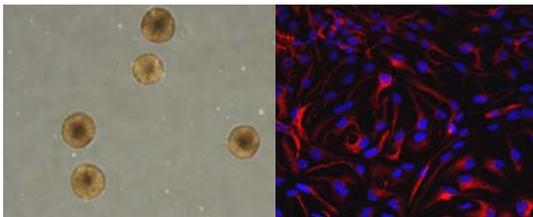


(図 1) iPS 様細胞 (図 2) 胚様体

本コロニーは、マウス ES 細胞様の形態を 25 継代以上まで維持でき、未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ染色および Nanog 抗体での免疫染色で陽性を示した。導入遺伝子の発現は、継代初期のコロニーに観察されたが、一方、8 継代以降では抑制された。また、3~5 日間の浮遊培養により胚様体を形成し (図 2)、その後の接着培養で外胚葉マーカーの class 3 β -tubulin、中胚葉マーカーの Desmin、内胚葉マーカーの Sox17 染色で陽性を示す細胞に分化した。以上のことから、マウス ES 細胞に類似した形態を持つ、イヌ iPS 様細胞株を作製することができた。

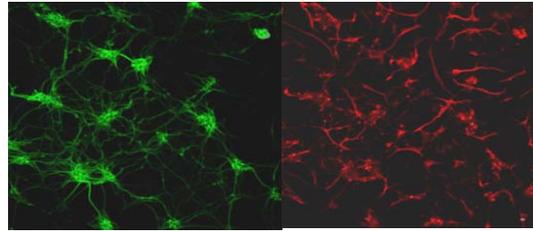
(2) iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導

①カニクイザル由来 ES 細胞をアストロサイト培養上清で 10 日間浮遊培養した際、神経幹細胞類似の浮遊細胞塊 (neurosphere) を形成した (図 3)。Neurosphere を B27 培地で 14 日間接着培養した後、蛍光免疫染色を行うと、神経幹細胞マーカーである nestin に陽性を示した (図 4)。



(図 3) neurosphere (図 4) nestin 陽性

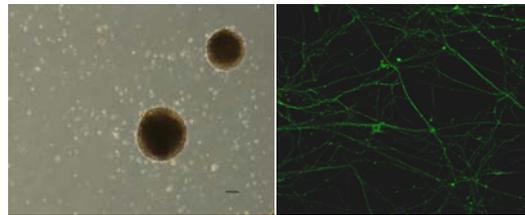
本 nestin 陽性細胞をアストロサイト培養上清で約 28 日間培養した後、蛍光免疫染色を行うと、幼若神経細胞マーカーである TuJ1 およびアストロサイトマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) に陽性を示し (図 5, 6)、一方、B27 培地に IGF-I を添加した培地で培養した細胞はオリゴデンドロサイトマーカーである O4 に陽性を示した。



(図 5) TuJ1 陽性 (図 6) GFAP 陽性

これらのことから、サル ES 細胞が神経幹細胞を経て、神経系細胞へと分化したことが明らかとなった。

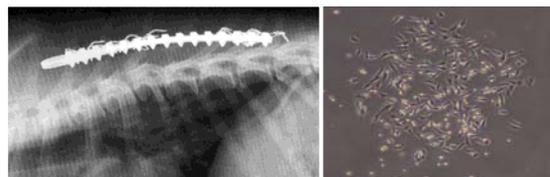
②イヌ iPS 様細胞株を約 10 日間 アストロサイト培養上清を用いて浮遊培養すると、neurosphere を形成した (図 7)。さらにこの neurosphere を B27 培地を用いて接着培養すると、得られた細胞は幼若神経細胞マーカーである TuJ1 染色で陽性を示した (図 8)。



(図 7) neurosphere (図 8) TuJ1 陽性

(3) 骨髄間質細胞を利用した脊髄損傷イヌの治療

①重度脊髄損傷を伴った胸腰部椎間板ヘルニアのイヌを用いて、脊髄の減圧および逸脱した椎間板物質の除去手術を行い (図 9)、術後 1 カ月の時点で感覚および運動機能に改善の認められないイヌに対して、第 5 および 6 腰椎間より脳脊髄液中へ自己の骨髄間質細胞 (図 10) を移植した。



(図 9) 脊髄減圧固定術 (図 10) 骨髄間質細胞

その結果、10頭中6頭が歩行可能となった。一方、椎間板物質の除去手術後に細胞を移植しなかった対照群では、13頭中2頭が歩行可能となった(表1)。

表1 コントロール群 (n = 13) および投与群 (n = 10) のTSCISの結果

| 経過 (月) | コントロール群 | 投与群 |
|--------|---------|-----|
| 0 | 0 | 0.8 |
| 1 | 0.5 | 3.2 |
| 2 | 1.2 | 5.0 |
| 3 | 2.3 | 5.4 |
| 4 | 2.3 | 5.6 |
| 5 | 2.3 | 5.6 |
| 6 | 2.3 | 5.6 |
| 7-48 | 2.3 | 5.6 |

② 重度脊髄損傷を受傷後1週間以内で、感覚および運動機能を欠如した胸腰部椎間板ヘルニアのイヌを用いて、脊髄の減圧および逸脱した椎間板物質の除去手術を行い、自己の骨髄間質細胞を第5および6腰椎間より脳脊髄液中へ移植して安全性の評価を行なった結果、7頭中2頭が歩行可能となり(表2)、治療29~62カ月後においても細胞移植による感染症や腫瘍形成は観察されなかった。

表2 治療後の運動機能評価

| 個体番号 | TSCIS |
|------|-------|
| 1 | 10.0 |
| 2 | 6.0 |
| 3 | 0 |
| 4 | 0 |
| 5 | 0 |
| 6 | 0 |
| 7 | 0 |

本研究の結果より、イヌiPS様細胞の作製、および本細胞から選択的に神経系細胞へ分化誘導することに成功した。さらに、骨髄間質細胞を代用した脊髄損傷イヌの細胞治療により、その安全性と有効性を評価したが、iPS細胞の利用については、今後、さらに検討していく予定である。

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9件)

①Nishida H, Shoji Y, Nakamura M, Hatoya

S, Sugiura K, Yamate J, Kuwamura M, Kotani T, Nakayama M, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. Methods for cell harvesting and the biological properties of canine bone marrow stromal cells at successive passages. Am. J. Vet. Res. 査読有、2012、印刷中. DOI:10.2460/ajvr.72.8.1118

②Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Harada Y, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. Safety of autologous bone marrow stromal cell transplantation in dogs with acute spinal cord injury. Vet. Surg. 査読有、2012、印刷中.

DOI:10.1111/j.1532-950X.2011.00959.x

③Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cell into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. Am. J. Vet. Res. 査読有、72巻、2011、1118-1123.

DOI:10.2460/ajvr.72.8.1118

④Tsukiyama T, Asano R, Kawaguchi T, Kim N, Yamada M, Minami N, Ohinata Y, Imai H. Simple and efficient method for generation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible factors and an EOS reporter system. Genes Cells. 査読有、16巻、2011、815-825.

DOI:10.1111/j.1365-2443.2011.01528.x

⑤Ohmura M, Torii R, Hatoya S, Sugiura K, Tamada H, Kawate N, Takahashi M, Sawada T, Inaba T. Induction of fertile oestrus in dioestrous bitches by prostaglandin F_{2α} and a GnRH-agonist1. Vet. Rec. 査読有、168巻、2011、669. DOI:10.1136/vr.d1183

⑥Sugiura K, Wijewardana V, Fujimoto M, Akazawa T, Yahata M, Mito K, Hatoya S, Inoue N, Inaba T. Effect of IL-12 on the canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. Vet. Immunol. Immunopathol. 査読有、137巻、2010、322-326.

DOI:10.1016/j.vetimm.2010.06.006

⑦Tamada H, Kawate N, Kawata N, Inaba T, Kida K, Hatoya S, Akune A, Nakama K, Kohsaka T, Sawada T. Detection of relaxin mRNA in the corpus luteum, uterus, and uterine cervix in the bitch. J. Vet. Med. Sci. 査読有、72巻、2010、1383-1386. DOI:10.1292/jvms.09-0485

⑧Mito K, Sugiura K, Ueda K, Hori T, Akazawa T, Yamate J, Hatoya S, Inaba M,

Inoue N, Ikehara S, Inaba T. INF γ markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. Cancer Res. 査読有、70 巻、2010、7093-7101. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0600

⑨Kioka N, Ito T, Yamashita H, Uekawa N, Umemoto T, Motoyoshi S, Imai H, Takahashi K, Watanabe H, Yamada M, Ueda K. Crucial role of vinexin for keratinocyte migration in vitro and epidermal wound healing in vivo. Exp. Cell Res. 査読有、316 巻、2010、1728-1738. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.03.019

〔学会発表〕(計7件)

①今井 裕、イヌにおけるマウス ES 細胞様の iPS 細胞の誘導、第 137 回日本生殖医学会関西支部集談会、2012 年 3 月 3 日、大阪

②稲葉俊夫、イヌ ES 細胞の研究から再生獣医療に向けて、第 17 回滋賀県獣医学会(招待講演)、2012 年 2 月 26 日、滋賀

③今井 裕、Establishment of canine induced pluripotent stem cells using retrovirus and maintenance of their pluripotency in culture. 第 2 回国際繁殖生物学会、2011 年 10 月 9 日、ケアンズ(豪州)

④稲葉俊夫、イヌ骨髄間質細胞の神経幹細胞に及ぼす影響、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 20 日、大阪

⑤稲葉俊夫、イヌ顆粒球減少症に向けたイヌ造血因子の作製、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 19 日、大阪

⑥今井 裕、イヌにおける人工多能性幹細胞樹立の試み、第 136 回日本生殖医学会関西支部集談会、2011 年 3 月 5 日、大阪

⑦稲葉俊夫、サル ES 細胞からのオリゴデンドロサイトへの簡便な分化誘導法、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 16 日、北海道

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoindb.acs.osakafu-u.ac.jp/profile/out.cudjDYHfHMO.PEVGDxV-iw==.html>

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

今井 裕 (IMAI HIROSHI)

京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：10303869

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・助教
研究者番号：40453138

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：