

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658266

研究課題名(和文)ネコiPS細胞を用いた慢性腎不全への細胞移植療法に関する基礎的検討

研究課題名(英文)Fundamental investigation on the cell transplantation therapy to the chronic renal failure using the feline iPS cell

研究代表者

星 史雄(Hoshi, Fumio)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：00219164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ネコ組織からAGPC法を用いてTotal-RNAを抽出し、Oligo-dTラテックスビーズ法を用いてmRNAを精製した後、ネコKlf4、Oct3/4、Sox2、およびAQP2遺伝子クローニングに成功した。ネコKlf4、Oct3/4、およびSox2は、pCI-neo Mammalian Vectorに挿入され、ネコ皮膚の初代線維芽細胞に導入を試みたが、iPS細胞の作出はできなかった。ネコAQP2は、pTrancer-EF-Bsdに挿入し、CrFK細胞と293細胞に導入したところ少数ではあるが、高発現GFP細胞が分離でき、有意に水分吸収量の増加がみられた。

研究成果の概要(英文)：Total-RNA was extracted from a feline tissue by using the AGPC method. Further total-RNA was purified to mRNA by the Oligo-dT latex beads method, and using this mRNA, the cloning of feline Klf4, Oct3/4, Sox2 and AQP2 gene was successful. The CDS of feline Klf4, Oct3/4 and Sox2 were inserted into pCI-neo Mammalian Vector. The fibroblast which it obtained from a feline skin tried the co-transfection of these vectors, but the iPS cell was not able to induce. While, feline AQP2 gene was inserted into pTrancer-EF-Bsd, and this vector was transfected into CrFK cell line and 293 cells line. It could isolate few high level expression GFP cell lines, and the increase of the water absorption was significantly higher than a control CrFK cell line in the water absorption study using the cell.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：ネコ 再生 腎臓

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全(CRF)になると、BUN等の浸透圧物質の体内蓄積により血漿浸透圧が上昇し、渇欲中枢が刺激されるため多飲多尿となる。ネコの場合、CRFはend stageでも浮腫を起さず、stageの進行にあわせ、飲水量より尿量が増大し脱水を来す。ネコの腎ネフロンは長ネフロンと呼ばれ、水分の再吸収が非常に激しく機能異常に陥った時は水分の再吸収機構が大きく障害される。また、CRFネコの脱水症状は、腎性尿崩症と類似性を示し、尿細管の水分再吸収ができないことに起因しており、これはAquaporin 2(AQP2)やArginine vasopressin 2型受容体(AVPR)の異常と考えられる。CRFネコにAQP2およびAVPR遺伝子を導入すれば、水和状態の維持が可能になる。しかし、現在の法律では臨床症例に遺伝子療法を行うことはできない。そこで、細胞移植にて拒絶反応のでないiPS(induced Pluripotent Stem)細胞を作出し、腎上皮細胞へと誘導した上でAQP2およびV2R遺伝子を導入し、できた細胞をCRFネコに細胞移植すれば水和状態の維持が可能になると考えている。

2. 研究の目的

末期腎不全ネコの皮膚線維芽細胞から得られたiPS細胞を腎上皮細胞まで誘導後、AQP2およびAVPR遺伝子を導入し、同一ネコに細胞移植することにより、末期腎不全で発症する持続性の重度な脱水を改善する治療法を確立することにある。この目的の遂行には、ネコでiPS細胞を誘導すること、iPS細胞を腎臓の上皮細胞まで誘導すること、ネコのAQP2遺伝子をクローニングし細胞に導入することなどが求められ、多くのハードルが存在するため、挑戦的胞芽研究での科学研究費申請を要請した。

3. 研究の方法

ネコの初期化因子(Klf4,Oct3/4,Sox2)をクローニングして、ネコ皮膚線維芽細胞へトランスフェクトすることによりネコiPS細胞を作出し、その細胞に各種腎上皮誘導因子(Pax-2/Wnt4/LIF)を加えた培養液で培養することにより、腎臓の上皮細胞への誘導を行う。一方で、ネコの腎臓から腎臓の水チャネルであるAQP2、および腎臓の抗利尿ホルモン・レセプターであるAVPRをクローニングし、この両遺伝子をiPS細胞由来の腎上皮細胞にトランスフェクトする。AQP2およびAVPRが過剰発現している細胞をクローニングして、ゲンタマイシン慢性腎不全モデルのネコにAQP2およびAVPR過剰発現腎上皮株を細胞移入する。細胞移入前後の尿比重、尿浸透圧、尿中AQP2濃度を測定することにより移植の成否について検討する。

(1) ネコAQP2およびAVPRの完全長cDNAの配列決定と発現ベクターへの組み込み

ネコ腎臓からAcid-Guanidium-Phenol-Chloroform(AGPC)法を用いてTotal-RNAを抽出し、Oligo-dTラテックスビーズ法を用いてmRNAを精製した後、他の動物種のAQP2およびAVPRの塩基配列から設計した遺伝子特異的primerを用いてRT-PCRを行い、それぞれの部分的cDNAを増幅させ、TAクローニング後、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いてその配列を分析する。得られた配列に従い、それぞれネコAQP2に特異的primerを設計し、5'および3'-RACE-PCR法を用いて増幅し、それぞれの5'端および3'端のDNA配列分析し、ネコAQP2遺伝子の再構築を行う。得られたそれぞれのcDNAを哺乳類細胞にトランスフェクト可能な高発現系ベクターであるpTracer-EF/Bsd(Invitrogen)にサブクローニングする。そのベクターをE.coli JM109 Competent Cells(タカラバイオ株式会社)にトランスフェクトし増幅する。

(2) ネコiPS誘導遺伝子(Klf4,Oct3/4,Sox2)完全長cDNAの配列決定と発現ベクターへの組み込み

ネコの各組織(精巣、卵巣、骨髄、大脳、および膵臓)からAGPC法を用いてTotal-RNAを抽出し、Oligo-dTラテックスビーズ法を用いてmRNAを精製した後、他の動物種のiPS誘導遺伝子(Klf4,Oct3/4,Sox2)の塩基配列から設計した遺伝子特異的primerを用いてRT-PCRを行い、それぞれの部分的cDNAを増幅させ、TAクローニング後、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzerを用いてその配列を分析する。得られた配列に従い、それぞれのネコiPS誘導遺伝子に特異的primerを設計し、5'および3'-RACE-PCR法を用いて増幅し、それぞれの5'端および3'端のDNA配列分析し、ネコiPS誘導遺伝子の再構築を行う。得られたそれぞれのcDNAを哺乳類細胞にトランスフェクト可能な高発現系ベクターであるpCl-neo Mammalian Vectorにサブクローニングする。そのベクターをE.coli JM109 Competent Cellsにトランスフェクトし増幅する。

(3) ネコiPS細胞の作出と腎上皮細胞への誘導

健康なネコを全身麻酔して、剃毛後、皮膚のパンチ・バイオブシーを行う。得られた皮膚から表皮を除いた後、細切しコラゲナーゼにより細胞の分散化を行う。分散化した皮膚線維芽細胞は10%FBS加DMEM/F12培養液でシャーレにて培養する。セミコンフルエントまで細胞が増加した後、上述の方法で作出されたiPS誘導遺伝子(Klf4,Oct3/4,Sox2)が導入されたベクターをトランスフェクトする。iPS様コロニーをクローニングして分離し、培地をES細胞用に替え、それぞれのコロニーから細胞を採取し、初期化因子(Nanog,FGF等)の発現状態をReal-Time PCRにて調べる。初期化因子の発現増加が認められたコロニーを増殖させ 1×10^6 まで細胞を増やし、

SCID マウス皮下に接種し、テラトーマの発生を確認する。テラトーマの確認された iPS 細胞コロニーに Pax-2/Wnt4/LIF 等の腎上皮化因子を加え、上皮細胞の誘導を行う。誘導後の細胞を抗 AQP1 および抗 AQP2 抗体を用いて免疫染色を行い、腎細胞の成否について判定する。

(4) iPS 細胞から誘導された腎上皮細胞への水再吸収遺伝子の導入
腎上皮化した iPS 細胞に、(1) で作出した AQP2 もしくは V2R 遺伝子または両遺伝子を同時にトランスフェクトし、導入された細胞の培養液中にネオマイシンを加えて培養する。ネオマイシン耐性で GFP 発現している細胞をクローニング後、その一部の細胞を抗 AQP2 にて免疫染色、遺伝子導入前の細胞と比較すると共に、細胞を溶解し western blotting 法を用いて量的な変動を明らかにし、両遺伝子が定常発現しており、かつ、過剰発現している細胞を探す。目的の細胞が検索できたなら、それぞれの蛋白質(AQP2 および V2R)が機能しているかどうかを調べる。すなわち、遺伝子導入細胞の培養液に AVP を加え、細胞外の水分量の減少をもって比較し、過剰発現の効果を検討する。

4. 研究成果

(1)ネコの各組織(精巣、卵巣、骨髄、腎臓)から AGPC 法を用いて Total-RNA を抽出し、Oligo-dT ラテックスビーズ法を用いて mRNA を精製した後、他の動物種の塩基配列から設計した遺伝子特異的 primer を用いて RT-PCR を行い、Klf4、Oct3/4、Sox2、および

Species	Nucleotid Homology(%)
Bovine	94.0
Homospience	89.4
Monkey	89.3
Mouse	88.0
Rat	87.8
Pig	81.3
Mean	88.3

図2.ネコ Klf の CDS と他の動物種の相同性

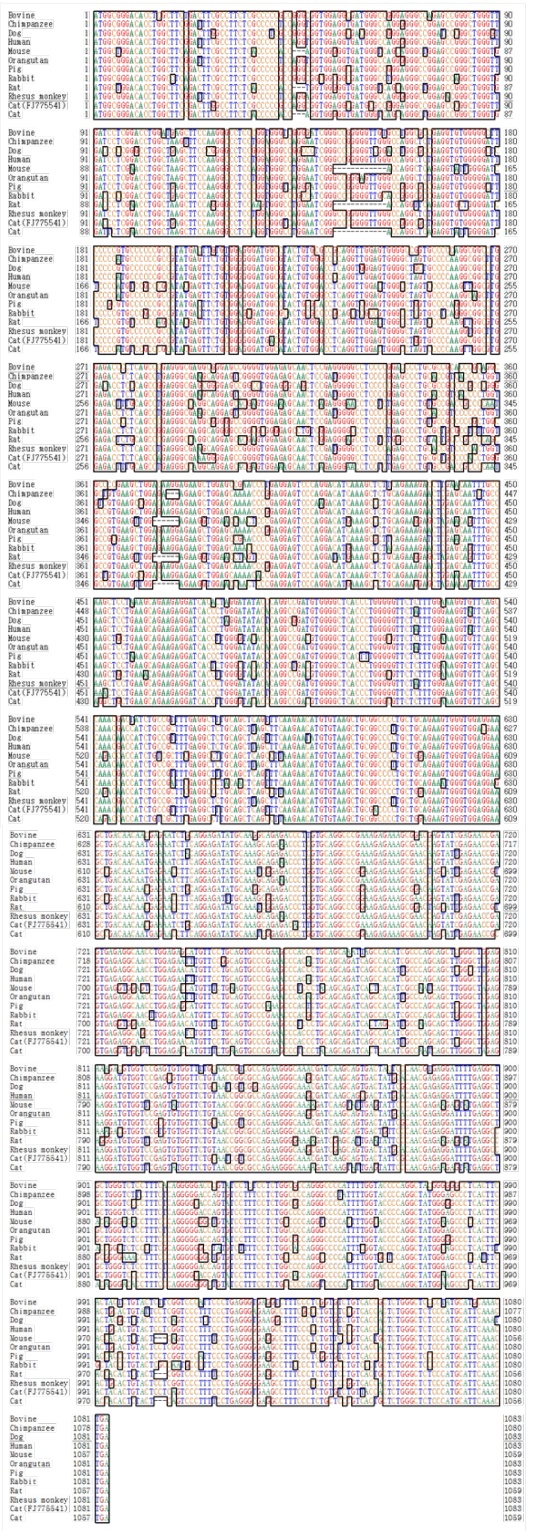


図3.ネコ Oct3/4 の CDS 塩基配列

図1. Klf4のCDS塩基配列

1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186
2187
2188
2189
2190
2191
2192
2193
2194
2195
2196
2197
2198
2199
2200
2201
2202
2203
2204
2205
2206
2207
2208
2209
2210
2211
2212
2213
2214
2215
2216
2217
2218
2219
2220
2221
2222
2223
2224
2225
2226
2227
2228
2229
2230
2231
2232
2233
2234
2235
2236
2237
2238
2239
2240
2241
2242
2243
2244
2245
2246
2247
2248
2249
2250
2251
2252
2253
2254
2255
2256
2257
2258
2259
2260
2261
2262
2263
2264
2265
2266
2267
2268
2269
2270
2271
2272
2273
2274
2275
2276
2277
2278
2279
2280
2281
2282
2283
2284
2285
2286
2287
2288
2289
2290
2291
2292
2293
2294
2295
2296
2297
2298
2299
2300
2301
2302
2303
2304
2305
2306
2307
2308
2309
2310
2311
2312
2313
2314
2315
2316
2317
2318
2319
2320
2321
2322
2323
2324
2325
2326
2327
2328
2329
2330
2331
2332
2333
2334
2335
2336
2337
2338
2339
2340
2341
2342
2343
2344
2345
2346
2347
2348
2349
2350
2351
2352
2353
2354
2355
2356
2357
2358
2359
2360
2361
2362
2363
2364
2365
2366
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
2374
2375
2376
2377
2378
2379
2380
2381
2382
2383
2384
2385
2386
2387
2388
2389
2390
2391
2392
2393
2394
2395
2396
2397
2398
2399
2400
2401
2402
2403
2404
2405
2406
2407
2408
2409
2410
2411
2412
2413
2414
2415
2416
2417
2418
2419
2420
2421
2422
2423
2424
2425
2426
2427
2428
2429
2430
2431
2432
2433
2434
2435
2436
2437
2438
2439
2440
2441
2442
2443
2444
2445
2446
2447
2448
2449
2450
2451
2452
2453
2454
2455
2456
2457
2458
2459
2460
2461
2462
2463
2464
2465
2466
2467
2468
2469
2470
2471
2472
2473
2474
2475
2476
2477
2478
2479
2480
2481
2482
2483
2484
2485
2486
2487
2488
2489
2490
2491
2492
2493
2494
2495
2496
2497
2498
2499
2500
2501
2502
2503
2504
2505
2506
2507
2508
2509
2510
2511
2512
2513
2514
2515
2516
2517
2518
2519
2520
2521
2522
2523
2524
2525
2526
2527
2528
2529
2530
2531
2532
2533
2534
2535
2536
2537
2538
2539
2540
2541
2542
2543
2544
2545
2546
2547
2548
2549
2550
2551
2552
2553
2554
2555
2556
2557
2558
2559
2560
2561
2562
2563
2564
2565
2566
2567
2568
2569
2570
2571
2572
2573
2574
2575
2576
2577
2578
2579
2580
2581
2582
2583
2584
2585
2586
2587
2588
2589
2590
2591
2592
2593
2594
2595
2596
2597
2598
2599
2600
2601
2602
2603
2604
2605
2606
2607
2608
2609
2610
2611
2612
2613
2614
2615
2616
2617
2618
2619
2620
2621
2622
2623
2624
2625
2626
2627
2628
2629
2630
2631
2632
2633
2634
2635
2636
2637
2638
2639
2640
2641
2642
2643
2644
2645
2646
2647
2648
2649
2650
2651
2652
2653
2654
2655
2656
2657
2658
2659
2660
2661
2662
2663
2664
2665
2666
2667
2668
2669
2670
2671
2672
2673
2674
2675
2676
2677
2678
2679
2680
2681
2682
2683
2684
2685
2686
2687
2688
2689
2690
2691
2692
2693
2694
2695
2696
2697
2698
2699
2700
2701
2702
2703
2704
2705
2706
2707
2708
2709
2710
2711
2712
2713
2714
2715
2716
2717
2718
2719
2720
2721
2722
2723
2724
2725
2726
2727
2728
2729
2730
2731
2732
2733
2734
2735
2736
2737
2738
2739
2740
2741
2742
2743
2744
2745
2746
2747
2748
2749
2750
2751
2752
2753
2754
2755
2756
2757
2758
2759
2760
2761
2762
2763
2764
2765
2766
2767
2768
2769
2770
2771
2772
2773
2774
2775
2776
2777
2778
2779
2780
2781
2782
2783
2784
2785
2786
2787
2788
2789
2790
2791
2792
2793
2794
2795
2796
2797
2798
2799
2800
2801
2802
2803
2804
2805
2806
2807
2808
2809
2810
2811
2812
2813
2814
2815
2816
2817
2818
2819
2820
2821
2822
2823
2824
2825
2826
2827
2828
2829
2830
2831
2832
2833
2834
2835
2836
2837
2838
2839
2840
2841
2842
2843
2844
2845
2846
2847
2848
2849
2850
2851
2852
2853
2854
2855
2856
2857
2858
2859
2860
2861
2862
2863
2864
2865
2866
2867
2868
2869
2870
2871
2872
2873
2874
2875
2876
2877
2878
2879
2880
2881
2882
2883
2884
2885
2886
2887
2888
2889
2890
2891
2892
2893
2894
2895
2896
2897
2898
2899
2900
2901
2902
2903
2904
2905
2906
2907
2908
2909
2910
2911
2912
2913
2914
2915
2916
2917
2918
2919
2920
2921
2922
2923
2924
2925
2926
2927
2928
2929
2930
2931
2932
2933
2934
2935
2936
2937
2938
2939
2940
2941
2942
2943
2944
2945
2946
2947
2948
2949
2950
2951
2952
2953
2954
2955
2956
2957
2958
2959
2960
2961
2962
2963
2964
2965
2966
2967
2968
2969
2970
2971
2972
2973
2974
2975
2976
2977
2978
2979
2980
2981
2982
2983
2984
2985
2986
2987
2988
2989
2990
2991
2992
2993
2994
2995
2996
2997
2998
2999
3000
3001
3002
3003
3004
3005
3006
3007
3008
3009
3010
3011
3012
3013
3014
3015
3016
3017
3018
3019
3020
3021
3022
3023
3024
3025
3026
3027
3028
3029
3030
3031
3032
3033
3034
3035
3036
3037
3038
3039
3040
3041
3042
3043
3044
3045
3046
3047
3048
3049
3050
3051
3052
3053
3054
3055
3056
3057
3058
3059
3060
3061
3062
3063
3064
3065
3066
3067
3068
3069
3070
3071
3072
3073
3074
3075
3076
3077
3078
3079
3080
3081
3082
3083
3084
3085
3086
3087
3088
3089
3090
3091
3092
3093
3094
3095
3096
3097
3098
3099
3100
3101
3102
3103
3104
3105
3106
3107
3108
3109
3110
3111
3112
3113
3114
3115
3116
3117
3118
3119
3120
3121
3122
3123
3124
3125
3126
3127
3128
3129
3130
3131
3132
3133
3134
3135
3136
3137
3138
3139
3140
3141
3142
3143
3144
3145
3146
3147
3148
3149
3150
3151
3152
3153
3154
3155
3156
3157
3158
3159
3160
3161
3162
3163
3164
3165
3166
3167
3168
3169
3170
3171
3172
3173
3174
3175
3176
3177
3178
3179
3180
3181
3182
3183
3184
3185
3186
3187
3188
3189
3190
3191
3192
3193
3194
3195
3196
3197
3198
3199
3200
3201
3202
3203
3204
3205
3206
3207
3208
3209
3210
3211
3212
3213
3214
3215
3216
3217
3218
3219
3220
3221
3222
3223
3224
3225
3226
3227
3228
3229
3230
3231
3232
3233
3234
3235
3236
3237
3238
3239
3240
3241
3242
3243
3244
3245
3246
3247
3248
3249
3250
3251
3252
3253
3254
3255
3256
3257
3258
3259
3260
3261
3262
3263
3264
3265
3266
3267
3268
3269
3270
3271
3272
3273
3274
3275
3276
3277
3278
3279
3280
3281
3282
3283
3284
3285
3286
3287
3288
3289
3290
3291
3292
3293
3294
3295
3296
3297
3298
3299
3300
3301
3302
3303
3304
3305
3306
3307
3308
3309
3310
3311
3312
3313
3314
3315
3316
3317
3318
3319
3320
3321
3322
3323
3324
3325
3326
3327
3328
3329
3330
3331
3332
3333
3334
3335
3336
3337
3338
3339
3340
3341
3342
3343
3344
3345
3346
3347
3348
3349
3350
3351
3352
3353
3354
3355
3356
3357
3358
3359
3360
3

図4. ネコOct3/4のCDSの相同性

Species	Nucleotide length(bp)	Nucleotide Homology(%)	
		Cat	Mean
Dog	1083	79.87	
Orangutan	1083	82.27	
Pig	1083	81.35	
Human	1083	82.09	
Rhesus m.	1083	82.55	
Chimpanzee	1080	81.48	
Bovine	1083	79.45	
Rabbit	1083	80.33	
Mouse	1059	99.43	
Rat	1059	93.58	
Mean			84.24
Cat	1059		

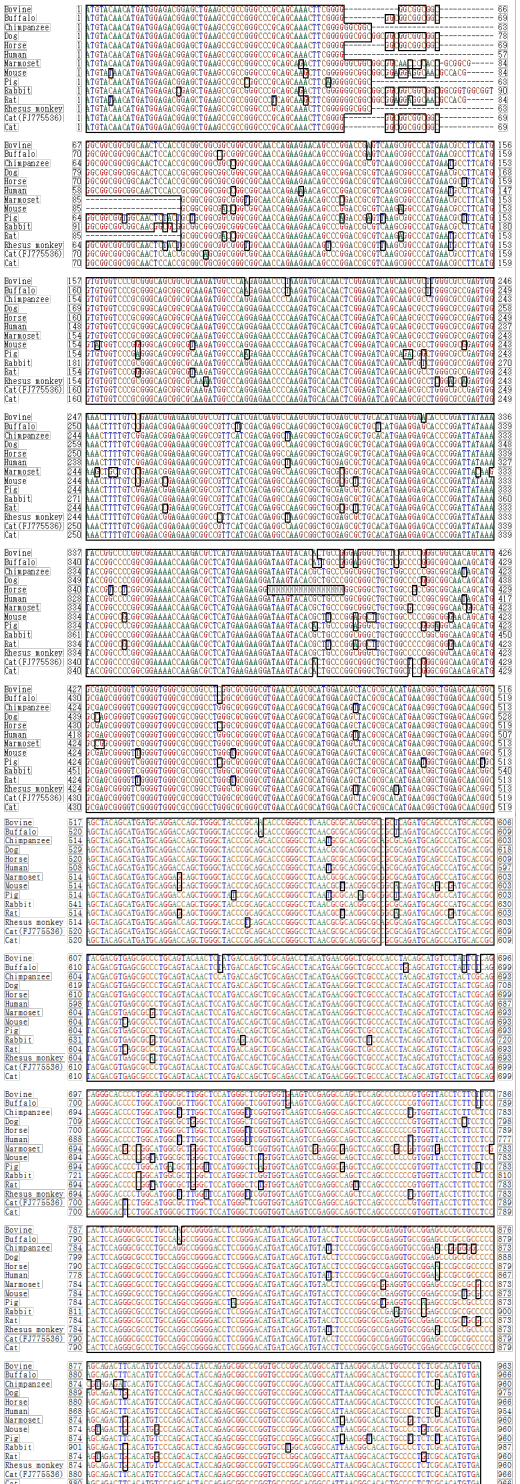


図5.ネコ Sox2 の CDS 塩基配列

Species	Nucleotide length(bp)	Nucleotide Homology(%)	
		Cat	Mean
Dog	975	98.36	
Horse	966	97.20	
Human	954	96.89	
Rabbit	987	95.85	
Bovine	963	97.62	
Buffalo	966	97.52	
Chimpanzee	960	96.79	
Rhesus m.	960	96.48	
Pig	960	95.24	
Marmoset	960	95.03	
Rat	960	94.72	
Mouse	960	94.62	
Mean			96.36
Cat	966		

図6. ネコSox2のCDS配列の相同性

び AQP2 の部分的 cDNA を増幅させ、TA クローニング後、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer を用いてその配列の分析をした。得られた配列に従い、それぞれネコ Klf4、Oct3/4、Sox2、および AQP2 に特異的 primer を設計し、5'および 3'-RACE-PCR 法を用いて増幅し、それぞれの 5'端および 3'端の DNA 配列分析し、ネコ Klf4(図 1、2)、Oct3/4 (図 3、4)、Sox2 (図 5、6) および AQP2 (図 7、8) 遺伝子の CDS 領域の再構築を行った。

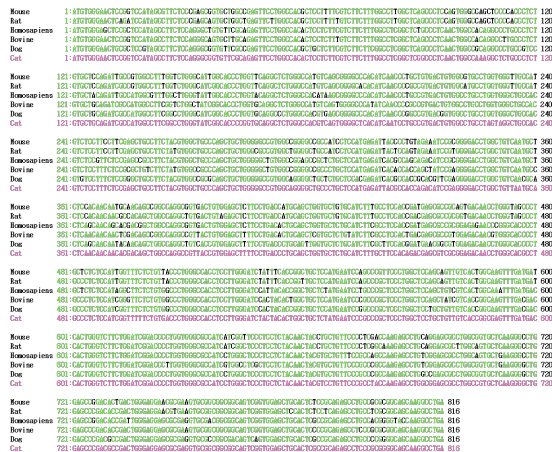


図7. AQP2のCDSの塩基配列

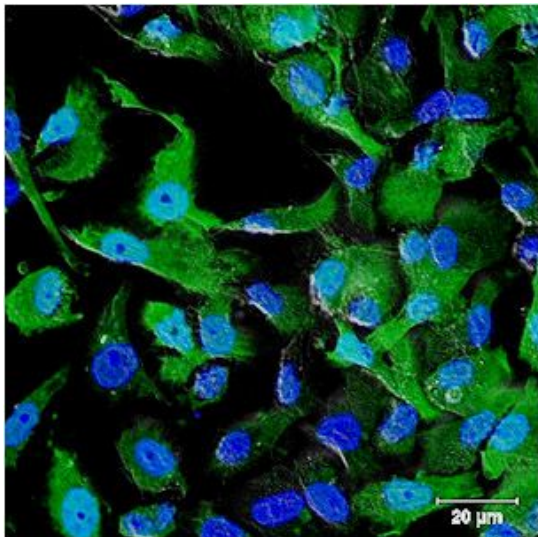
Species	Nucleotide Homology(%)
Homospience	90.20
Bovin	91.43
Dog	91.54
Mouse	86.64
Rat	86.28
mean	89.21

図8. ネコAQP2のCDS配列の相同性

(2)得られた遺伝子 (Klf4、Oct3/4、および Sox2) の CDS 部分は、哺乳類細胞にトランスフェクト可能な高発現系ベクターである pCl-neo Mammalian Vector にサブクローニングした後、ネコの皮膚から得られた初代線維芽細胞を培養し、3つの初期化遺伝子を Lipofectamine(Life Technology)を用いてネ

コ線維芽細胞由来 iPS 細胞の作出を試みたが、細胞への遺伝子導入は失敗に終わった。そこで、Bio-Rad 社の Gene Pulser Xcell ならびに、Nepa-gene 社の NEPA21 を用いたエレクトロポレーションシステムを試みた。しかし、十分な導入効率は得られなかった。この原因の一つは、3 因子の pCl-neo Mammalian Vector を用いた co-transfection にあると考え、ヒトの遺伝子ではあるが 3 因子が一つのプラスミドに導入された Vector である pCx-OKS-2A(addgene)を用いて行ってみたが同様に導入効率は上がらなかった。

(3)一方、iPS 細胞が作成できなかったため、ネコ AQP2 遺伝子は、その CDS 部分を pTrancer-EF-Bsd(Life Technology)にサブクローニングし、導入効率をみるために、培養株化細胞であるネコの CrFK 細胞(JCRB 細胞バンク)とヒトの 293 細胞(理化学研究所)を用いて AQP2 がゲノム中へ導入できるか検討し、導入細胞に水チャンネルが過剰発現するかを試みた。その結果、極少数(図 9)、



遺伝子の導入効率を上げないと実用には使用出来ないレベルであった。少数の得られた細胞株を用いて、その細胞の水分吸収量を測定したところ、わずかながら、水分吸収量に有意差がみられた(図 10)。いずれの実験も遺伝子の導入効率が悪く、それを上げる必要があることがわかった。

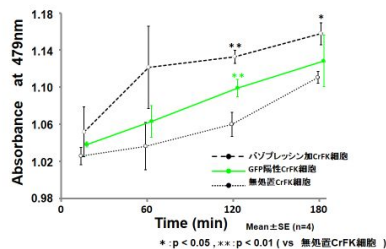


図10. AQP2の水吸収による培養上清の吸光度変化

(4)iPS 細胞誘導の基礎実験には、初代線維芽細胞が大量に必要になり、その細胞が用意できるまでに膨大な時間が必要であるため、iPS 細胞誘導のソース細胞として使用するた

めに、ネコの皮膚から初代の線維芽細胞を採取し、それを 20 代に渡り継代し、無限増殖できるネコの線維芽細胞株を樹立できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)
 〔学会発表〕(計 0 件)
 〔図書〕(計 0 件)
 〔産業財産権〕
 出願状況(計 0 件)
 取得状況(計 0 件)
 〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

星 史雄(Hoshi Fumio)
 北里大学・獣医学部・准教授
 研究者番号：00219164