

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24380172

研究課題名(和文) イヌES細胞・iPS細胞の血液系再生医療に向けた応用的基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of basic technologies for cell therapy using ES and iPS cells for blood diseases in dogs

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(系)・教授

研究者番号：00137241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：イヌES細胞およびiPS細胞の血液系再生医療に向けた応用的基盤技術の開発を目的に検討し、以下の成果を得た。イヌiPS細胞から血小板に分化誘導することができた。長期継代可能なイヌiPS細胞株を作製した。遺伝子組換えの無いイヌiPS細胞を作製することができた。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。ネコフリーズドライ精子を用いた顕微授精により、体外成熟卵子から胚盤胞期胚を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was in the development of basic technologies for cell therapy using ES and iPS cells for blood disorders in dogs, and the following results were obtained. We successfully generated canine iPS cells, and differentiated them into platelets. We established a stable and long-term culture of canine iPS cells. We generated transgene-free canine iPS cells. We generated new canine stem cell lines that closely resemble to extraembryonic endoderm cells. We successfully obtained feline blastocysts from in vitro-matured oocytes following intra-cytoplasmic sperm injection with freeze-dried spermatozoa.

研究分野：農学

キーワード：再生医療 統合動物科学 ES細胞 iPS細胞 バイオテクノロジー イヌ

1. 研究開始当初の背景

イヌはヒトと同様な癌の自然発症がみられる唯一の動物種であることから、疾病研究、非臨床試験等に多くの需要がある。研究代表者らはこれまでに、イヌ ES 細胞の分離・培養や、イヌ iPS 細胞の作製に成功している。しかし、これらのイヌ多能性幹細胞の長期継代培養や有用な組織細胞へ分化誘導する技術を確立するには至っていない。一方、イヌで多く発生するリンパ腫のような血液系の腫瘍に対して多様な抗腫瘍薬を用いる化学療法において、骨髄抑制による貧血などが大きな問題となっている。これらの治療に輸血が必要となる場合が多いが、イヌではヒトのような血液銀行は確立されておらず、ドナー確保の難しさから、その改善が求められている。それゆえに、イヌ ES 細胞や iPS 細胞の株化や輸血に必要な赤血球や血小板などの血液系細胞へ分化誘導する技術の開発が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、イヌ ES 細胞および iPS 細胞の血液系再生医療に向けた応用的基盤技術の開発を目的として、両細胞の長期培養法の確立、および遺伝子導入を介さない iPS 細胞誘導系の開発を行うとともに、両細胞を効率的に血小板等の血液系細胞に分化誘導する。これにより、伴侶動物の再生獣医療の研究が推し進められるとともに、ヒト医学への応用も可能となる。

3. 研究の方法

(1)イヌ iPS 細胞の作製と血小板への分化誘導：従来の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、イヌ iPS 細胞を作製し、得られた細胞を血小板へ分化誘導することを試みた。

(2) 長期継代可能なイヌ iPS 細胞株の作製：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、上記の4つの多能性維持遺伝子をイヌ胎子線維芽細胞に導入することで、イヌ iPS 細胞株の作製を試みた。

(3) 遺伝子組換えの無い安全なイヌ iPS 細胞の作製：細胞質内で遺伝子を複製することができるエピソームベクターあるいはセンダイウイルスベクター(SeVdp)を用いて安全なイヌ iPS 細胞の作製を試みた。

(4)血液系細胞へ簡便に分化誘導できるイヌ複能性幹細胞の作製：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、上記の4つの多能性維持遺伝子の導入を行い、低分子阻害剤を同時に添加し、イヌ人工誘導胚体外内胚葉(iXEN)細胞の作製を試みた。

(5) イヌの発情はおよそ半年に1回で、この特異な繁殖生理学的特徴から、受精卵を用いたイヌ ES 細胞の作製は材料の入手に制限がある。これを克服するために、材料採取の簡便なネコの卵子を用いて、顕微授精による体外成熟卵子から胚盤胞期胚の作製を試みた。

4. 研究成果

(1)イヌ iPS 細胞の作製と血小板への分化誘導

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をイヌ胎子線維芽細胞に導入することで、iPS 様細胞コロニーを得た(図1A)。本コロニーはマウス iPS 細胞と同様の立体型を示し、28 継代まで維持できた。また未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(AP) (図1B)、*Nanog*、*TRA-1-60* および *SSEA4* 染色陽性を示し、RT-PCR で *NANOG*、*OCT3/4* および ES 細胞特異的な *REX1* 遺伝子の発現が確認された(図2)。さらに、浮遊培養により胚様体を形成し、その後の接着培養で三胚葉マーカーのいずれかの抗体に陽性を示し、これらの遺伝子を発現する細胞に分化することが確認された。16 継代後の染色体数は $2n=78$ の正常2倍体で、性染色体は雄型を示した。

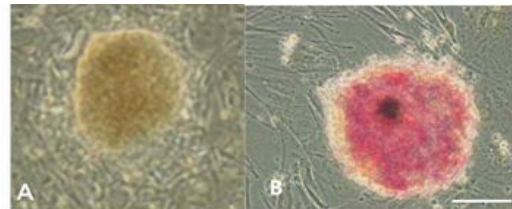


図1. レンチウイルスベクターを用いて作製したイヌ iPS 細胞コロニー

A: 初代コロニー、B: AP 染色陽性コロニー

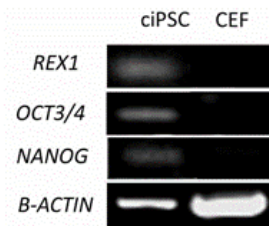


図2. RT-PCR によるイヌ iPS 細胞の内因性遺伝子の発現

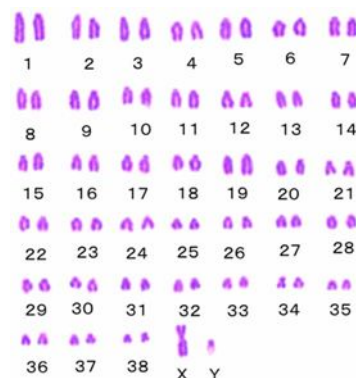


図3. 16 継代のイヌ iPS 細胞における核型分析

上記で得たイヌ iPS 細胞を、造血サイトカインを分泌する骨髄間質細胞由来フィーダー細胞の OP9 細胞株を播種したディッシュ上

で、ES細胞分化培地に血管内皮細胞増殖因子を加えた培地を用いて14~15日間培養した。その後、幹細胞因子、ヘパリンおよびトロポポエチン添加培地に替えて再播種した結果、ギムザ染色およびフローサイトメトリーによって成熟巨核球に分化することが確認された。また同時に、血小板マーカー陽性で、成犬血中の血小板と同様の大きさの粒子が観察され、電子顕微鏡で血小板構造を有していることが確認された(図4)。この血小板様粒子はフィブリノゲンとの結合能を有していることがわかった。

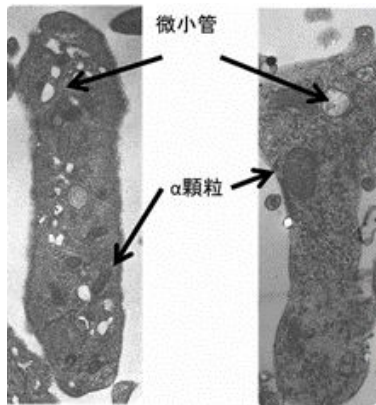


図4. 電子顕微鏡による分離血小板の構造観察 左：末梢血中から分離した血小板 右：イヌ iPS細胞由来血小板

イヌ iPS細胞を神経誘導培地で培養することで神経幹細胞マーカーである Nestin に陽性を示す細胞を得た。本細胞は各神経系細胞誘導培地で培養することにより、幼若神経細胞、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトの各マーカーの免疫染色に陽性を示す細胞へ分化可能な神経幹細胞の特性を有していた(図5)。

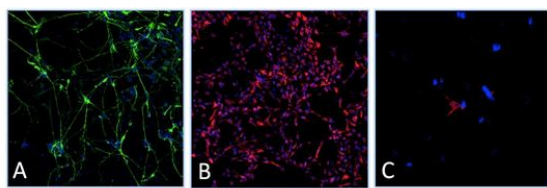


図5. イヌ iPS細胞由来神経系細胞 A 幼若神経細胞、B アストロサイト、およびC オリゴデンドロサイトの各マーカーの免疫染色に陽性を示す細胞

(2) 長期継代可能なイヌ iPS細胞株の作製
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ることにより、本薬剤依存性に増殖する細胞コロニーが得られ、50継代以

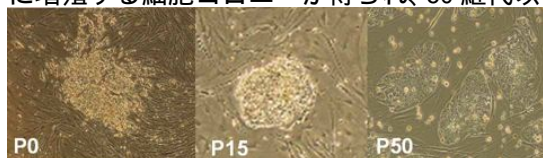


図6. ドキシサイクリン誘導性イヌ iPS細胞の長期継代

上維持できた(図6)。本細胞は、OCT3/4、NANOGなどの未分化マーカーを発現した。また、ドキシサイクリン非存在下では本細胞は増殖を止め、その外因性遺伝子発現は培養6日で完全に抑制された(図7)。

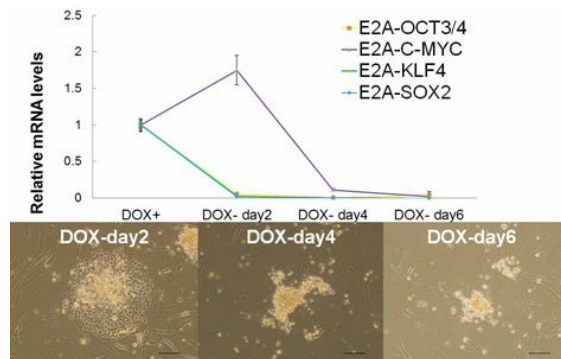


図7. イヌ iPS細胞のドキシサイクリン非存在下における外因性遺伝子発現の経時的変化

本細胞株は浮遊培養にて胚様体を形成し、三胚葉へ分化することが確認された。さらに、本細胞株は単一細胞での継代が可能で、しかも、フィーダー細胞を必要とせず、マトリゲル上で増殖・継代させることができた。本細胞株は、既報のイヌ iPS細胞で必須とされる白血病阻害因子(LIF)も必要とせず、Erk1/2シグナルを介して未分化状態を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新規のイヌ iPS細胞株と考えられた。

薬剤誘導性イヌ iPS細胞株を間葉系幹細胞(MSC)分化培地で培養することにより、紡錘形の形態を示し、CD44およびCD90陽性、CD34およびCD45陰性を示すMSC様細胞が得られた。本MSC様細胞は骨および神経への分化能を有し、10継代以上維持できた(図8)。

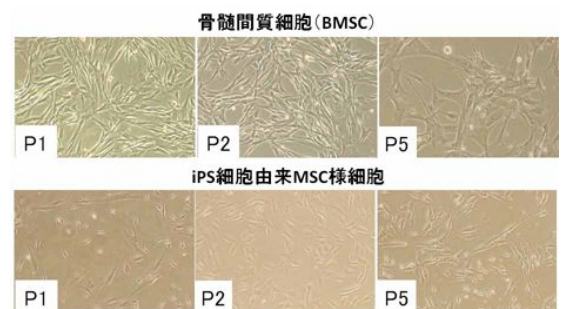


図8. 継代に伴う細胞形態の変化
上段：生体由来MSCである骨髓間質細胞
下段：iPS細胞由来MSC様細胞

(3) 遺伝子組換えの無い安全なイヌ iPS細胞の作製

ヒトOCT3/4、SOX2、KLF4およびc-MYC(山中4因子)など種々の初期化遺伝子を組み込んだプラスミドDNA(染色体に組み込まれないエピソーマルベクター)をエレクトロポレーション法で遺伝子導入することにより、核/細胞質比の高いイヌ iPS様細胞コロニーが

得られ、6 継代まで維持できたが、AP 染色は陰性を示した (図 9)

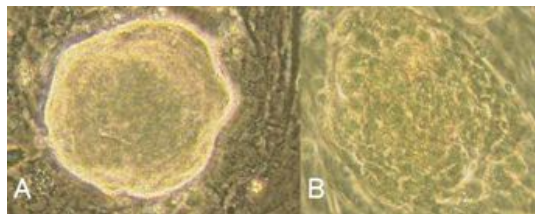


図 9 . エピソーマルベクターを用いて作製したイヌ iPS 細胞コロニー

A: 初代コロニー、B: AP 染色陰性コロニー

遺伝子挿入のない持続発現型 RNA ウイルスベクターであるセンダイウイルスベクター (SeVdp) を用いて 4 つの多能性関連遺伝子をイヌ胎子線維芽細胞に導入することにより、iPS 様細胞コロニーが得られ、7 継代まで維持できた。また AP 染色は陽性を示した (図 10)

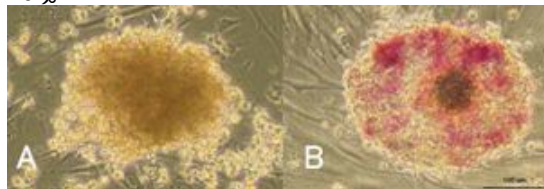


図 10 . SeVdp を用いて作製したイヌ iPS 細胞コロニー

A: 初代コロニー、B: AP 染色陽性コロニー

(4) 血液系細胞へ簡便に分化誘導できるイヌ複能性幹細胞の作製

イヌ胎子線維芽細胞に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を導入した。その後、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た結果、細胞は立体的なコロニーを形成した。本コロニーは継代を重ねると、扁平でタイル状の形態を示し、ドキシサイクリン無添加、およびフィーダー細胞の無い状態で 50 継代以上まで維持できた (図 11)。免疫染色では、NANOG 染色陰性、OCT3/4 染色弱陽性および XEN 細胞マーカー染色陽性を示す細胞が確認された (図 12)



図 11 . 扁平でタイル状形態の 13 継代細胞

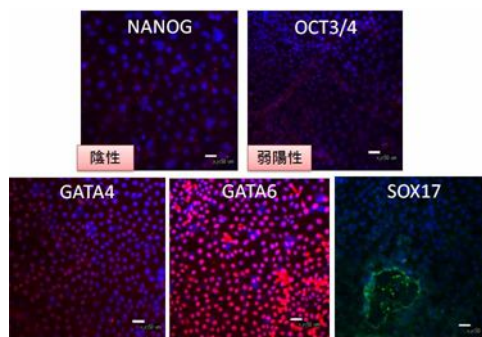


図 12. 16 継代細胞の免疫染色

量的 RT-PCR では、XEN 細胞マーカー、近位内胚葉マーカー、および遠位内胚葉マーカー遺伝子の発現が確認された。また、10 継代後には外因性多能性関連転写遺伝子の発現は確認されず、サイレンシングが起きていた。長期継代後の染色体数は $2n = 78$ の正常 2 倍体で、性染色体は雌型を示した。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。

iXEN 様細胞株の免疫調節能を調べた結果、コンカナバリン A で活性化したイヌ末梢血単核球 (PBMC) との共培養後、免疫抑制作用を持つプロスタグランジン (PG)₂ 産生量の増加が確認され (図 13)、CD4 陽性細胞の割合の減少が観察された。また、PBMC から分化誘導した未成熟樹状細胞 (DC) は共培養により、成熟を阻害された。

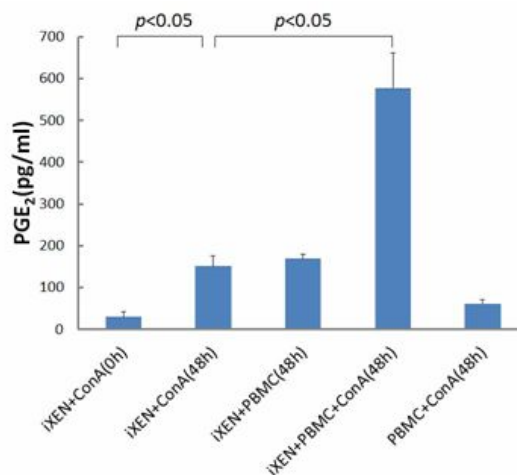


図 13 . iXEN 様細胞株の培養上清中 PGE₂ 濃度

iXEN 様細胞株の内胚葉系および中胚葉系への分化能を評価するために、OP9 細胞と共培養した結果、多核の多角形状で、イヌアルブミン、CYP3A4、および FOXA2 遺伝子の発現を示す肝細胞様細胞と AP 染色陰性、MRP2 陽性を示す毛細胆管膜様細胞の 2 種類の細胞が観察された (図 14)

iXEN 様細胞株を MSC 成長培地で培養した結果、紡錘形で、MSC マーカーである CD44 および CD90 に陽性、造血系・白血球マーカーである CD34 および CD45 に陰性を示す MSC 様細胞

胞が得られた。

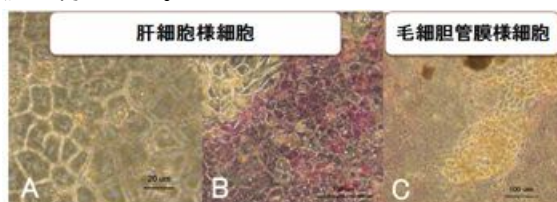


図 14. iXEN 様細胞株の OP9 細胞共培養後の顕微鏡写真

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

(5) ネコ精巣上体から成熟精子を回収し、ガラスアンプルに入れ、真空凍結乾燥機でフリーズドライ精子を作製した。4 で半年間保存した本精子を用いた顕微授精により、体外成熟卵子から胚盤胞期胚を得ることに成功した(図 15)。

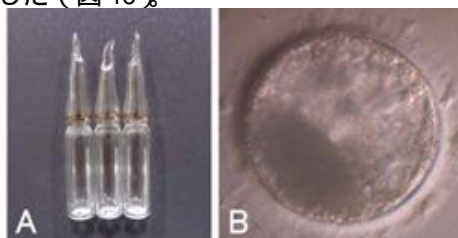


図 15. ネコフリーズドライ精子(A)と顕微授精後に得られた胚盤胞期胚(B)

本研究の結果より、イヌ iPS 細胞から血小板への分化誘導、長期継代可能なイヌ iPS 細胞株の作製、遺伝子組換えの無いイヌ iPS 細胞の作製、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の作製、およびネコフリーズドライ精子を用いた顕微授精による胚盤胞期胚の作製に成功した。これらの技術は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。

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 23 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

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

Sahare M, Kim SM, Otomo A, Komatsu K, Minami N, Yamada M, Imai H. Factors supporting long-term culture of bovine male germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 査読有、28 巻、2016、2039-2050

DOI: org/10.1071/RD15003

Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M. Imai H. Generation of naive bovine induced pluripotent stem cells using PiggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factors. *PLoS One*, 査読有、10 巻、2015、e0135403

DOI: 10.1371/journal.pone.0135403

Sahare M, Otomo A, Komatsu K, Minami N, Yamada M, Imai H. The role of signaling pathways on proliferation and self-renewal of cultured bovine primitive germ cells. *Reproductive Medicine and Biology*, 査読有、14 巻、2015、17-25
DOI: 10.1007/s12522-014-0189-x

Takahashi M, Tsuchiya H, Hamano S, Inaba T, Kawate N, Tamada H. Clinical study report on milk production in the offspring of a somatic cell cloned Holstein Cow. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、59 巻、2013、595-598
Doi: 10.1262/jrd.2013-025

Takahashi M, Sawada K, Kawate N, Inaba T, Tamada H. Improvement of superovulatory response and pregnancy rate after transfer of embryos recovered from Japanese black cows fed rumen bypass polyunsaturated fatty acids. *Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有、75 巻、2013、1485-1490
Doi: 10.1292/jvms.12-0235

Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Sugiura K, Wijewardana V, Kuwamura M, Tanaka M, Yamate J, Izawa T, Takahashi M, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T. Generation of functional platelets from canine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development*, 査読有、22 巻、2013、2026-2035
Doi: 10.1089/scd.2012.0701

Isaji Y, Murata M, Takaguchi N, Mukai T, Tajima Y, Imai H, Yamada M. Valproic acid

treatment from the 4-cell stage improves Oct4 expression and nuclear distribution of histone H3K27me3 in mouse cloned blastocysts. Journal of Reproduction and Development, 査読有、59 巻、2013、196-204
Doi: 10.1262/jrd.2012-156

〔学会発表〕(計 4 8 件)

Unzaki 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)

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)

〔図書〕(計 1 件)

今井 裕、朝倉書店、iPS 細胞の樹立と細胞分化、2014、143-154

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：イヌ人工誘導胚体外内胚葉細胞株の作製方法

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 2 8 年 6 月 1 0 日

国内外の別：国内

名称：イヌ i P S 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 2 7 年 6 月 1 9 日

国内外の別：国内

名称：イヌ i P S 細胞の作製方法

発明者：稲葉俊夫、西村俊哉、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、桑村充、山手丈至、井澤武史

権利者：公立大学法人大阪府立大学

種類：特許

番号：特許願 2013-033588 号

出願年月日：平成 2 5 年 2 月 2 2 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

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・准教授
研究者番号：40453138

玉田 尋通 (TAMADA, Hiromichi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：10155252

川手 憲俊 (KAWATE, Noritoshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：80221901

谷 浩行 (TANI, Hiroyuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：00305658

高橋 正弘 (TAKAHASHI, Masahiro)

岩手大学・農学研究科・准教授
研究者番号：50582334