

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780311

研究課題名(和文)輸血製剤への応用を目指したネコ多能性幹細胞の培養および血液分化技術の開発

研究課題名(英文) Culture of feline pluripotent stem cells and development of hematopoietic differentiation methods to aim for clinically applying for blood transfusion

研究代表者

鳩谷 晋吾 (Hatoya, Shingo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：40453138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞とiPS細胞をネコで作製し、それを血液細胞へ分化させることを目的として、以下の成果を得た。

ピエゾマイクロマニピュレーターを用いた顕微授精でネコ胚盤胞期胚を作製し、ネコES細胞コロニーの作製に成功した。ネコLIFを大腸菌で作製し、その機能を確認した。ネコ胎子線維芽細胞にレトロウイルスを用いてOct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycの4遺伝子を導入し、ネコiPS様細胞株の樹立に成功した。ネコ体細胞にセンダイウイルスを用いて初期化遺伝子を導入し、ネコiPS様細胞株コロニーの作製に成功した。ネコiPS様細胞からマクロファージと赤芽球系の血液細胞へ分化させることができた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to establish feline ES (embryonic stem) cell lines and iPS (induced pluripotent stem) cell lines, and to induce hematopoietic cells from these stem cells. The following results were obtained.

Blastocyst formation was observed using piezo-ICSI, and primary feline ES-like cell colonies were formed from blastocysts. We confirm the successful production for the first time of biologically active feline LIF within E.coli. We transduced four transcriptional factors (mouse Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) into fetal fibroblast cells of domestic cats with retrovirus vector, and could establish an iPSC-like cell line. We transduced four transcriptional factors into fetal fibroblast cells of domestic cats with sendai virus vector, and primary feline iPS-like cell colonies were formed. Feline iPS-like cells can be differentiated into macrophages and erythroid cells.

研究分野：獣医学

キーワード：iPS細胞 ES細胞 ネコ 多能性幹細胞 再生医療 獣医学 血液分化 顕微授精

## 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な幹細胞を用いた再生医療が発展してきており、ヒトで骨髄間質細胞を用いた臨床応用が実用化されている。獣医学領域においても申請者らは、骨髄間質細胞を用いた神経再生の臨床応用を行ってきた (Am J Vet Res.2011)。さらに、多くの注目を集めているのが ES 細胞および iPS 細胞を用いた再生医療研究である。現在、これらの多能性幹細胞は主にマウスやヒトで作製され、これを用いた再生医療研究が世界中で競争されている。

研究申請者は、獣医学領域における再生医療のさらなる促進を目的として、イヌにおける体外受精の確立 (Theriogenology. 2006、2009) およびイヌ ES 細胞株の樹立を目指し、その結果、イヌ ES 様細胞を分離・培養することに世界で初めて成功した (Mol Reprod Dev. 2006)。また、イヌ iPS 細胞の作製にも着手し、体細胞からイヌ iPS 細胞のコロニーの作製に成功している (日本獣医学会第 149 回大会 2010 年)。さらに、ネコにおける再生医療研究としてネコの体外受精技術を確立し、多数の胚盤胞期胚を供給することによってネコ ES 細胞を分離・培養できることも明らかにする (日本小動物獣医師会 2010 年次学会) と共に、ネコ iPS 細胞の初代培養にも成功している。

ネコにおいては、慢性腎不全、糖尿病、白血病などヒトと同様の慢性疾患があり、これらに対する新しい治療法として ES 細胞・iPS 細胞は、有力な材料になると予想される。さらに、これらの幹細胞を用いた再生獣医療の中で、特に重要となる分野として血液が挙げられる。現在、獣医療においても、さまざまな貧血や腫瘍の治療に対して輸血が必要な症例が増加している。しかしながら、獣医学領域では輸血用血液の供給システムが成熟していないために、血液の不足が大きな問題となっている。特に、ネコはイヌと比較しても採血が難しく、採血可能な量が少ないことから、輸血が難しい動物である。さらに、輸血用ドナーネコからの感染症の危険性も完全には排除できないため安全な血液の確保が求められている。また、血小板減少症や DIC (播種性血管内凝固症候群) に対する治療では血小板輸血が必要であるが、獣医学領域ではほとんど応用されていないのが現状である。

以上のことをふまえて、申請者が主に開発にかかわってきた小動物の ES 細胞・iPS 細胞技術をさらに発展させ、これらの細胞を赤血球や血小板などの血液細胞へ分化させることで獣医臨床応用への道筋をつかみたいと考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、様々な細胞に分化できる能力をもつ多能性幹細胞である ES 細胞 (胚性幹細胞) と iPS 細胞 (人工多能性幹細胞)

をネコで作製し、それを血液前駆細胞や赤血球、血小板などの血液細胞へ分化させることで、貧血や血小板減少症などの疾病に臨床応用することである。

具体的な目標としては、以下のようになる。

**(1)ピエゾマイクロマニピュレーターを用いた顕微授精でネコ胚盤胞期胚を作製し、ES 細胞株を作製する。**

**(2)多能性幹細胞の培養に必要なと考えられるサイトカインであるネコ LIF (白血球阻止因子) を大腸菌で作製する。**

**(3)ネコ体細胞にレトロウイルスを用いて Oct3/4、Sox2、Klf4 および c-Myc の 4 遺伝子を導入し、ネコ iPS 様細胞株を樹立する。**

**(4)ネコ体細胞にセンダイウイルスを用いて初期化遺伝子を導入し、ネコ iPS 様細胞株を樹立する。**

**(5)作製したネコ iPS 様細胞から血液細胞を分化誘導させる。**

## 3. 研究の方法

**(1)ピエゾマイクロマニピュレーターを用いた顕微授精および ES 細胞株の作製**

避妊手術で得たネコ卵巣から未成熟卵子を回収し、20%O<sub>2</sub> 下で体外成熟した。この成熟卵子にピエゾマイクロマニピュレーターを用いた顕微授精を用いて凍結融解精巣上体精子を注入した。その後 7%エタノール 5 分間処置にて活性化した ICSI (+) 群と無処置の ICSI 群に分けて体外培養を行い、培養 2 日後における卵割率、培養 7 日後における桑実胚および胚盤胞期胚への発生率を、精子を用いない Sham 群と比較した。

得られたネコ胚盤胞期胚より内部細胞塊を取り出し、マウス胎子線維芽細胞と共培養することによって、ネコ ES 細胞の分離・培養を行った。

**(2)ネコ LIF の作製**

ネコ胎子線維芽細胞から RNA を抽出し、RT-PCR でネコ LIF cDNA を増幅した。これを pGEM-T Easy Vector に組み込んでクローニングを行い、塩基配列を解析した。

成熟タンパク質となる配列のみをタンパク質発現ベクター pCold-TF DNA に組み込み、大腸菌 BL21 を形質転換した。大腸菌のタンパク質発現を誘導した後にタンパク質を回収し、SDS-PAGE を行った。

回収タンパク質の LIF としての活性を調べるため、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) に対する未分化性維持効果をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色により、ヒト赤白血球細胞株 (TF-1 細胞) に対する増殖促進効果を Cell Counting Kit-8 により検討した。

**(3)レトロウイルスを用いたネコ iPS 様細胞株の樹立**

ネコ胎子線維芽細胞にレトロウイルスを用いてマウス OCT3/4、SOX2、KLF4 および c-MYC

の4遺伝子を導入した。フィーダー細胞上に再播種する際、ウシ胎児血清(FBS)またはロックアウト血清代替物(KSR)添加ヒト胚性幹細胞培地それぞれにおける、初代コロニー形成に最適な細胞数を検討した。さらに、各培地における初代コロニー形成効率および継代数を比較した。

樹立細胞株の形態、化学染色または免疫染色により未分化マーカーの発現、RT-PCRにより各継代数の遺伝子発現(導入4遺伝子およびNanog)を評価した。また、細胞株を浮遊培養して胚葉体形成能を調べるとともに、接着培養した際の分化能を免疫染色により評価した。染色体異常を調べるため、核型分析を行った。

#### (4) センダイウイルスを用いたネコ iPS 様細胞株の樹立

ネコ胎児線維芽細胞にセンダイウイルスを用いてヒトOCT3/4、SOX2、KLF4およびc-MYCの4遺伝子を導入した。4遺伝子を導入したネコ胎児線維芽細胞をフィーダー細胞上に再播種し、ヒト胚性幹細胞培地を用いて培養した。得られた細胞の形態、継代数、未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)の発現を評価した。また、抗センダイウイルス核タンパク抗体を用いた免疫染色、および核型分析を行った。

#### (5) ネコ iPS 様細胞から血液細胞への分化誘導

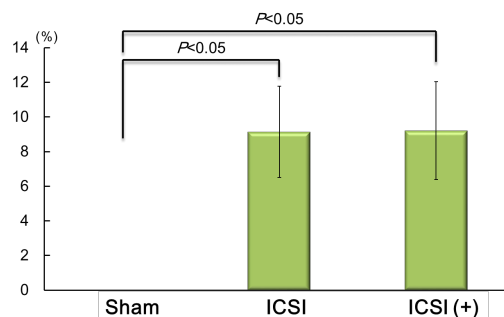
当教室にてレトロウイルスを用いて作製したネコ iPS 細胞を5日間浮遊培養し、胚様体を作製した。その後、血液分化用培地に造血系細胞への分化を誘導する幹細胞成長因子などの各種サイトカインを添加し、15~20日間浮遊培養した。分化誘導した細胞をメチルセルロース培地に播種し、約10日間培養することで造血コロニーの形成能を調べるとともに、構成細胞をライト・ギムザ染色後に光学顕微鏡下で観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) ピエゾマイクロマニピュレーターを用いた顕微授精およびES細胞株の作製

卵割率は、ICSI(+)群ではSham群、ICSI群に比べて有意に増加し( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )、桑実胚、胚盤胞期胚への発生率は、Sham群と比べてICSI群、ICSI(+)群で有意に増加した( $P<0.05$ )。以上のことから、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いた顕微授精によってネコ胚盤胞期胚の作製が可能となった。

胚盤胞期胚から内部細胞塊を分離し、マウス胎児線維芽細胞と共培養したところ、ヒトES細胞に類似した形態を示すネコES様細胞コロニーが観察された。しかしながら、これらの細胞を長期間継代培養することはできなかった。



顕微授精7日後の胚盤胞期胚への発生率

#### (2) ネコ LIF の作製

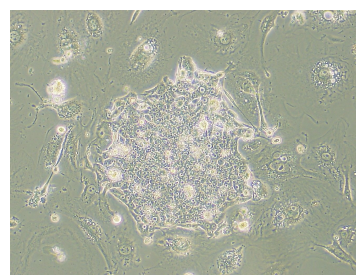
クローニングにより609 bpのcDNAを得た。成熟タンパク質に相当する配列は540 bpであり、ヒトLIFアミノ酸配列と90%が一致した。

SDS-PAGEにより、目的タンパク質の予想分子量である70 kDa付近にバンドを確認した。さらにThrombinによりタグ配列を除去し、ネコLIFの予想分子量である20 kDaのタンパク質を分離した。

作製したネコLIFはマウスES細胞の未分化性を維持し、TF-1細胞の増殖を促進した。以上の結果から、生理活性のあるネコLIFの作製に成功した。

#### (3) レトロウイルスを用いたネコ iPS 様細胞株の樹立

FBS添加培地では低い、KSR添加培地では高い細胞数において初代コロニーの形成効率が高かった。初代コロニー形成効率はKSR添加培地で有意に高かったが、FBS添加培地で作製・継代したコロニーは多くが長期継代可能であり、そのうちの1つは45継代以上まで維持できた。

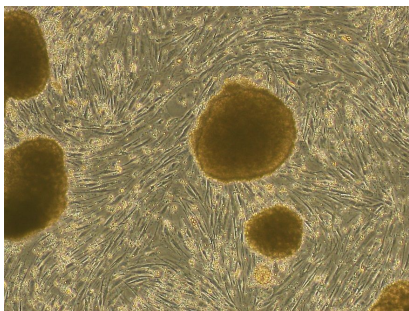


作製されたネコ iPS 様細胞

樹立した細胞株は明確な核小体、高い核/細胞質比と細胞間密度、明瞭な細胞間境界を有するヒトiPS細胞と類似した形態を示した。また、ALP、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、Nanogの未分化マーカーを発現し、継代数の多いものでは導入遺伝子は検出されず、すべての継代数でNanog遺伝子は検出された。さらに各胚葉のマーカー(外胚葉; Tuj1、中胚葉; Desmin、内胚葉; Sox17)に陽性を示す細胞へ分化した。核型は $2n=38$  XY型を示し、長期継代後も正常であった。

#### (4) センダイウイルスを用いたネコ iPS 様細胞株の樹立

培養 5 日以降から iPS 様細胞コロニーが出現し、コロニー形成効率は約 0.05%であった。コロニー形態は立体型を示した。本細胞は 30 継代以上の維持が可能で、長期継代後も ALP に陽性を示した。センダイウイルス核タンパクは検出されなかった。核型は  $2n=38$  XY 型を示した。



センダイウイルスベクターで作製されたネコ iPS 様細胞のコロニー

#### (5) ネコ iPS 様細胞から血液細胞への分化誘導

ネコ iPS 細胞の分化誘導により、赤芽球系の造血コロニーである BFU-E に類似したコロニーを得ることができた。本コロニーにおいては、形態的に多数のマクロファージと少数の赤芽球系の細胞が観察された。

#### 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 4 件)

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. J Vet Med Sci. 2015. [Epub ahead of print]

査読有

Wijesekera DP, Sugiura K, Yuba E, Ueda K, Wijewardana V, Kanegi R, Nishimura T, Ushigusa T, Hatoya S, Kono K, Inaba T. Enhancement of anti-tumor immune responses by transfection of IFN gene into tumor using a novel type synthetic vector.

Vet Immunol Immunopathol. 2014 ;162(1-2):59-64.

doi: 10.1016/j.vetimm.2014.08.016.

査読有

Tamai R, Furuya M, Hatoya S, Akiyoshi H, Yamamoto R, Komori Y, Yokoi S, Tani K, Hirano Y, Komori M, Takenaka S. Profiling of serum metabolites in canine lymphoma

using gas chromatography mass spectrometry.

J Vet Med Sci. 2014 ;76(11):1513-8.

査読有

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 Dev. 2013 ;22(14):2026-35. doi: 10.1089/scd.2012.0701.

査読有

[学会発表](計 10 件)

淀江京平、鳩谷晋吾、金城凌二、杉浦喜久弥、大高真奈美、西村健、中西真人、高橋正弘、川手憲俊、玉田尋通、稲葉俊夫

センダイウイルスベクター (SeVdp) を用いたネコおよびイヌ iPS 細胞の作製

第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月 9-12 日、北海道大学 (北海道・札幌)

三埜晃佑、西村俊哉、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、今井 裕、高橋正弘、川手憲俊、玉田尋通、稲葉俊夫

成犬体細胞からの iPS 細胞樹立の試み

第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月 9-12 日、北海道大学 (北海道・札幌)

#### 鳩谷晋吾

イヌ・ネコ iPS 細胞の作製の試みと今後の展望

第 9 回 日本獣医再生医療学会

2014 年 3 月 2 日 マイドーム大阪 (大阪府・大阪市)

#### 鳩谷晋吾

イヌ・ネコ iPS 細胞の樹立と将来の展望

平成 25 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会

2014 年 2 月 22 日 幕張メッセ (千葉県・千葉市)

藤木花奈、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、高橋正弘、川手憲俊、玉田尋通、稲葉俊夫

ネコの体外受精法の改善に向けた酸素濃度および顕微授精についての検討

第 156 回日本獣医学会学術集会

2013 年 9 月 22 日 岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

Kanegi, R., Hatoya, S., Takenaka, S., Nishimura, T., Wijewardana, V., Sugiura, K., Takahashi, M., Kawate, N., Tamada, H., Inaba, T.

Generation of induced pluripotent stem cells and production of leukemia

inhibitory factor (LIF) in domestic cats  
The International Society for Stem Cell  
Research (ISSCR) 11th Annual Meeting  
2013年6月13日 ポストン、米国

Nishimura, T., **Hatoya, S.**, Kanegi, R.,  
Sugiura, K., Wijewardana, V., Kuwamura, M.,  
Tanaka, M., Takahashi, M., Kawate, N.,  
Tamada, H., Imai, H., Inaba, T  
Generation of functional platelets from  
canine induced pluripotent stem cells  
The International Society for Stem Cell  
Research (ISSCR) 11th Annual Meeting  
2013年6月14日 ポストン、米国

### **鳩谷晋吾**

獣医療における再生医療～iPS細胞の樹立  
第9回日本獣医内科学アカデミー学術大会  
2013年2月24日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

金城綾二、**鳩谷晋吾**、杉浦喜久弥、竹中重  
雄、玉田尋通、川手憲俊、高橋正弘、稲葉俊  
夫  
ネコ iPS 細胞株樹立と多能性維持タンパク質  
ネコ LIF の作製  
第154回日本獣医学会学術集会  
2012年9月14-16日 岩手大学(岩手県・盛  
岡市)

西村俊哉、**鳩谷晋吾**、杉浦 喜久弥、今井 裕、  
玉田尋通、川手憲俊、高橋正弘、稲葉 俊夫  
イヌ iPS 細胞の作製と血小板への分化誘導  
第154回日本獣医学会学術集会  
2012年9月14-16日 岩手大学(岩手県・盛  
岡市)

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：