

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07747

研究課題名(和文) 遺伝子挿入のない安全なイヌ・ネコiPS細胞を用いた赤血球分化誘導の検討

研究課題名(英文) Investigation of erythroid differentiation using transgene-free canine and feline induced pluripotent stem cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子挿入のない安全なiPS細胞をイヌとネコで作製し、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。

センダイウイルスベクターを用いてイヌとネコの胎子線維芽細胞にGFPを導入することができた。ネコでは、6因子とTGF 阻害剤を添加することでiPS細胞の作製に成功した。これらは各種未分化マーカーの発現および3胚葉への分化能を確認した。イヌでは、4因子とTGF 阻害剤を添加することでiPS細胞の作製に成功した。また、自然に除去されるSeVdpを用いてヒトiPS細胞に類似した細胞コロニーが得られた。しかしながら、これらiPS細胞の血液細胞分化について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 establish genome integration-free canine and feline induced pluripotent stem cells (ciPSCs), and to induce hematopoietic cells from these stem cells. The following results were obtained.

We confirmed that the Sendai virus vector (SeVdp) could infect canine and feline embryonic fibroblasts by detecting GFP expression. We could reprogram feline embryonic fibroblasts into iPS-like cells using SeVdp containing 6 transcription factors with TGF-beta inhibitor. These cells were positive for pluripotent markers. We transduced four transcriptional factors into canine fibroblast cells with SeVdp, and could established iPS-like cell line using TGF-beta inhibitor. Finally, we reprogrammed canine embryonic fibroblasts using the auto-erasable defective and persistent SeVdp, and canine iPS-like cells were formed. Further studies are required to induce hematopoietic cells from these canine or feline stem cells.

研究分野：獣医学

キーワード：iPS細胞 多能性幹細胞 再生医療 獣医学 イヌ ネコ 血液

### 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な細胞に分化できる能力をもつ iPS 細胞を用いた再生医療研究が盛んとなり、日本では世界で初めての臨床試験として、加齢黄斑変性の患者に iPS 細胞から作製した網膜色素上皮の細胞シートが移植されて話題となっている。獣医療でも日本におけるイヌ・ネコの飼育頭数が 2000 万頭近くあり、ヒトの医療と同様に最先端の治療が求められている。申請者らは獣医学領域での再生医療実現を目指して、イヌ ES 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)。さらに、この知見を活かして体細胞からイヌ iPS 細胞の作製に成功している (Stem Cells Dev. 2013)。同様にネコ iPS 細胞の作製にも成功しており国際幹細胞学会 (2013 年ボストン) で発表を行っている。

iPS 細胞は、数種類の初期化遺伝子を体細胞に導入することで作製される。申請者らが今までに作製したイヌ・ネコ iPS 細胞はレトロウイルスベクターなどを用いて遺伝子導入しており、宿主細胞ゲノムに初期化遺伝子が挿入されることから、腫瘍化などの危険性があり治療に応用するためには安全性の問題がある。一方、申請者らは大学付属獣医臨床センターで内科診療を担当しており、イヌやネコで血液腫瘍や慢性腎臓病による貧血に多く遭遇するが、ヒトのような血液バンクがないため輸血用血液の不足や輸血を介した感染が大きな問題となっている。

### 2. 研究の目的

現在、様々な細胞に分化できる能力をもつ iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) を用いた再生医療が注目されており、臨床応用が期待されている。一方、獣医学分野では輸血システムが整備されておらず、貧血のイヌやネコに対してドナーの確保が難しいことが問題となっている。本研究では、安全で臨床応用可能なイヌとネコの iPS 細胞を作製し、これを利用して赤血球を大量に作製することで、獣医療における輸血問題を解決する。具体的な研究項目は以下の 2 つである。

獣医学分野において安全で臨床応用が可能なイヌとネコの iPS 細胞を作製する。

イヌ・ネコ iPS 細胞から赤血球系細胞へ分化誘導する技術を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) センダイウイルスベクターを用いたイヌ・ネコへの遺伝子導入の検討

イヌとネコの iPS 細胞の臨床応用に向けて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) を用いた方法により、イヌおよびネコ iPS 細胞の作製を試みた。

イヌおよびネコの胎子線維芽細胞に SeVdp

を用いて GFP 遺伝子を導入し、その発現を蛍光顕微鏡で観察した。

イヌおよびネコの線維芽細胞にヒト OCT3/4、SOX2、KLF4 および c-MYC の 4 遺伝子を感染力価および温度条件を変えて導入し、各条件における SeVdp の感染効率を免疫染色により調べた。

4 遺伝子を導入したイヌおよびネコ胎子線維芽細胞をノックアウト血清代替物 (KSR) またはウシ胎子血清 (FBS) を加えたヒト ES 細胞培地で、マイトマイシン C 処理マウス胎子線維芽細胞と共培養した。

#### (2) センダイウイルスベクターを用いたイヌ・ネコ iPS 細胞作製効率改善の検討

(1) でイヌとネコの iPS 様細胞コロニーを得ることに成功したが、その作製効率は低く、SeVdp の除去もできていない。そのため、次に iPS 細胞コロニー形成の効率化および SeVdp の除去を試みた。

ネコ胎子線維芽細胞に SeVdp を用いて、多能性関連遺伝子であるヒト OCT3/4、SOX2、KLF4 および c-MYC の 4 因子を導入後、フィーダー上に播種し、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・継代数の評価、アルカリフォスファターゼ (AP) 染色、核型解析、未分化マーカーの免疫染色および PCR、三胚葉マーカーの免疫染色を行った。さらに、これらの細胞株を siRNA 処理することで SeVdp の除去を行い、PCR により SeVdp の有無を確認した後に培養を試みた。

イヌ胎子線維芽細胞へ SeVdp を用いてヒト OCT3/4、SOX2、KLF4、C-MYC (4 因子) を導入後、bFGF と LIF を添加した KSR 培地で培養した。感染後 4 日間、TGF 阻害剤である SB431542 あるいは A83-01 をそれぞれの濃度で添加し、出現したコロニー数から初期化効率を比較した。得られた iPS 様細胞を物理的に継代し、培養後の細胞の未分化性をアルカリフォスファターゼ (AP) 染色、RT-PCR および免疫染色にて評価した。さらに胚様体を作製し、RT-PCR にて三胚葉マーカーの発現を調べた。また siRNA 処理後に RT-PCR にて SeVdp の除去の有無を確認した。

#### (3) センダイウイルスベクターを用いたイヌ・ネコへの遺伝子導入の検討

(2) でイヌとネコの iPS 様細胞コロニーを得ることに成功し長期継代が可能であったが、SeVdp の除去が難しいことが多い。そのため、ネコでは siRNA を用いた SeVdp 除去条件の検討、イヌでは自然に除去される仕組みをもった違うタイプの SeVdp による iPS 細胞作製を試みた。

ネコ胎子線維芽細胞に SeVdp を用いて、多能性関連遺伝子であるヒト OCT3/4、SOX2、KLF4 および c-MYC の 4 因子を導入後、TGF 阻害剤である SB431542 を 0~6  $\mu$ M、あるいは A83-01 を 0~4  $\mu$ M でそれぞれ培地中に添加し、初代コロニーの形成効率を比較した。また SB431542 の添加を SeVdp 感染後 1~4 日、4~7 日、あるいは 1~7 日に行い、初代コロニーの形成効率および未分化マーカー発現を評価した。

ネコ胎子線維芽細胞に SeVdp を用いて、上記 4 因子とヒト NANOG および LIN28 を加えた 6 因子を導入後、A83-01、EGF、および Forskolin (FSK) を培地中に添加し、初代コロニーの形成効率および未分化マーカーの発現を調べた。また、siRNA 処理にて SeVdp の除去後、継代数および未分化マーカー発現を評価した。

イヌ胎子線維芽細胞に自然に除去される仕組みをもった SeVdp を用いてヒト OCT3/4、SOX2、KLF4 および c-MYC の 4 因子を導入し、iPS 細胞の作製および SeVdp が除去されるかを PCR で調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) センダイウイルスベクターを用いたイヌ・ネコへの遺伝子導入の検討

イヌとネコの iPS 細胞の臨床応用に向けて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) を用いた方法により、ネコおよびイヌ iPS 細胞の作製を試みた。

イヌおよびネコの胎子線維芽細胞に GFP の発現が確認でき、遺伝子導入時のウイルス力価に依存して GFP 発現細胞数の増加が見られた。

SeVdp の感染効率を免疫染色により調べた結果、ウイルス力価に依存して感染率が上昇し、MOI=7 以上の力価でプラトーに達した(図 1,2)。また低温で遺伝子導入を行うことで、SeVdp の感染効率が向上することがわかった。

##### 免疫染色

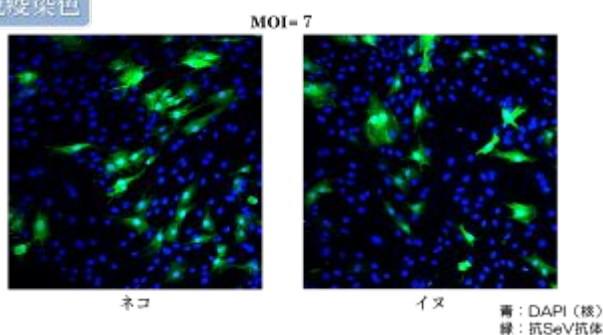
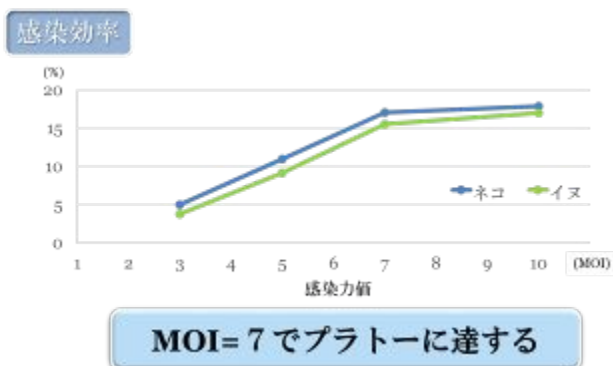


図 1: SeVdp 感染後の線維芽細胞

図 2: SeVdp の感染力価



FBS 群に比べて KSR 群で iPS 様細胞の初代コロニーが多数出現し、そのコロニーは未分化マーカーである ALP に陽性を示した(図 3)。

##### 未分化マーカー (ALP) 陽性

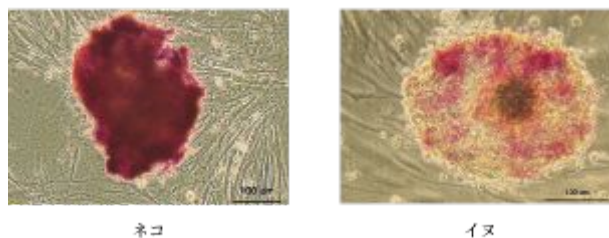


図 3: イヌ、ネコ iPS 様細胞は ALP 陽性を示す

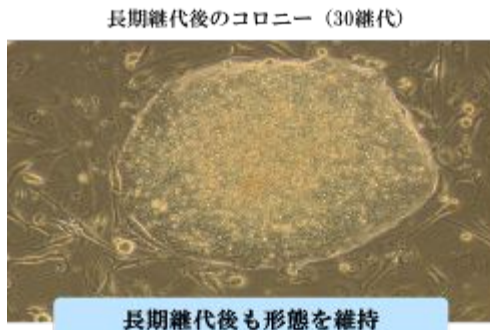
以上のことから、SeVdp を用いた遺伝子導入により、イヌおよびネコ iPS 様細胞コロニーを得ることに成功した。さらに、ネコ iPS 様細胞では長期間継代可能な細胞株が得られている。

##### (2) センダイウイルスベクターを用いたイヌ・ネコ iPS 細胞作製効率改善の検討

イヌとネコの iPS 様細胞コロニーを得ることに成功したが、その作製効率は低く、SeVdp の除去もできていない。そのため、次に iPS 細胞コロニー形成の効率化および SeVdp の除去を試みた。以下のような結果が出ている。

感染後 10 日目で扁平型の形態を示すネコ iPS 細胞様コロニーが出現した。これらの細胞は、P30 以上の長期継代が可能であり、AP 染色陽性で 2n=38XY 型の正常核型を示した(図 4)。免疫染色では OCT3/4、NANOG、SSEA-4、TRA1-60 陽性であり、PCR で OCT3/4、NANOG 陽性を示した。また浮遊培養により胚様体を形成し、その後の接着培養で SOX17、DESMIN、TUBULIN に陽性を示した。また、PCR で siRNA 処理による SeVdp 除去を確認したが、除去後の細胞は、長期間継代培養できなかった。

図 4：ネコ iPS 様細胞は、扁平のヒト型 iPS 細胞に類似していた



TGF 阻害剤を添加することでヒト型 iPS 細胞に類似したイヌ iPS 様細胞コロニーが出現した(図 5)。初期化効率は無処置群と比較して SB431542 添加では有意な上昇は認められなかったが、A83-01 を 2  $\mu\text{M}$  以上で添加することで有意に上昇した(図 6)。継代後のコロニーは扁平型を維持し、AP 染色に陽性を示した(図 7)。RT-PCR にて内因性 OCT3/4、SOX2、NANOG、免疫染色にて NANOG、SSEA4、TRA-1-60 の発現を確認したが、SeVdp の存在も同時に認められた。さらに胚様体を形成し、RT-PCR にて三胚葉マーカーである FOXA2、TUBLIN、DESMIN に陽性を示した。また siRNA により SeVdp の除去が確認され、除去後の細胞も Primed 型の形態を維持していた。

図 5：得られたイヌ iPS 様細胞

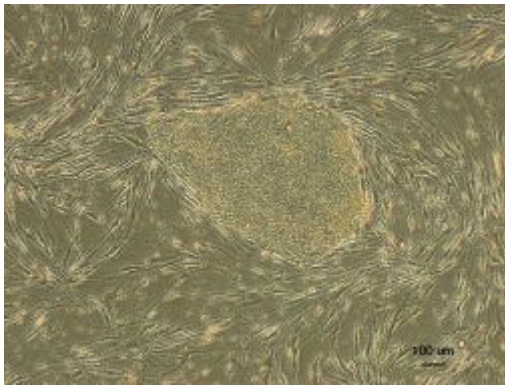


図 6：TGF- 阻害剤の効果  
結果

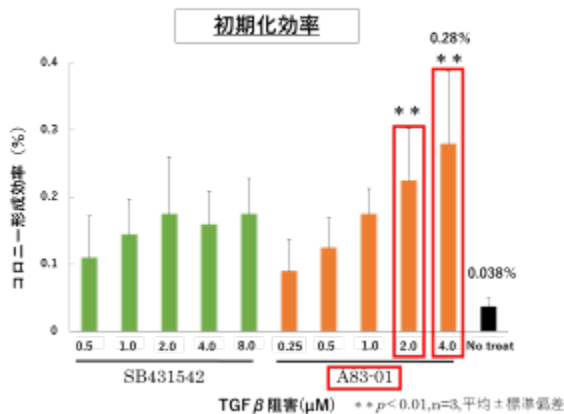
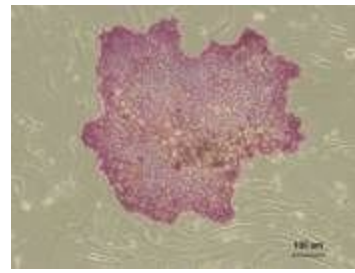


図 7：ALP 染色陽性を示す



(3) センダイウイルスベクターを用いたイヌ・ネコ iPS 細胞株樹立の試み

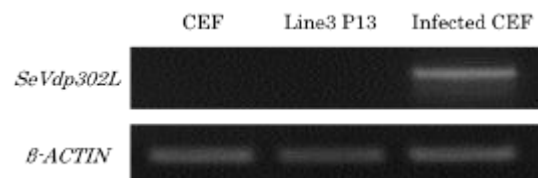
イヌとネコの iPS 様細胞コロニーを得ることに成功し長期継代が可能であったが、SeVdp の除去が難しいことが多く、安定した iPS 細胞の作製に問題があった。そのため、ネコでは siRNA を用いた SeVdp 除去条件の検討、イヌでは自然に除去される仕組みをもった違うタイプの SeVdp による iPS 細胞作製を試みた。その結果、以下のような結果が出ている。

ネコ iPS 様細胞の初代コロニーの形成効率は、4 因子に SB431542 を 2  $\mu\text{M}$  以上で、一方 A83-01 では 0.25  $\mu\text{M}$  以上の添加により、無処置群と比較して有意に改善した。また、A83-01 は SB431542 よりも形成効率が高かった。本形成効率は SB431542 の添加を 1~4 日にすると 0.02 %、1~7 日で 0.025 %であったが、4~7 日では 0 %であった。しかし、得られた細胞は免疫染色で OCT3/4 陽性を示したが、AP 染色陰性であり十分未分化性を維持できなかった。

ネコ iPS 様細胞の初代コロニーの形成効率は 6 因子のみでは 0 %であったが、添加因子を加えると上昇し、6 因子+A83+EGF+FSK で 2.2%と最も高かった。すべてのコロニーは AP 染色陽性であり、免疫染色では OCT3/4、TRA1-60 に陽性を示した。さらに SeVdp 除去後の細胞は長期継代が可能であり、OCT3/4 に陽性を示した。

イヌ胎子線維芽細胞に自然に除去される仕組みをもった SeVdp を用いて遺伝子導入したところ、ヒト iPS 細胞の類似した細胞コロニーが得られた。この細胞は、長期継代が可能であり、さらに継代を経ることで自然に SeVdp が除去されることが確認された(図 8)。現在、この細胞株の性状を解析中である。

図 8 継代後、PCR にて SeVdp の除去が確認された





以上のことから、イヌおよびネコにおいて、センダイウイルズベクターを用いて安全性の高いイヌおよびネコ iPS 細胞作製の道筋がつけられた。しかしながら、これらの細胞を血液細胞へ分化する技術については今後検討が必要であると思われた。

#### 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9件)

: Ushigusa T, Koyama Y, Ito T, Watanabe K, Chambers JK, Hasegawa A, Uchida K, Kanegi R, Hatoya S, Inaba T, Sugiura K. Innate immunity mediated by dendritic cells/macrophages plays a central role in the early period in tumor treatment using gene of Mycobacterium tuberculosis antigen. J Vet Med Sci. 2018;80(2):190-196. doi: 10.1292/jvms.17-0466.

: De Silva NH, Akazawa T, Wijewardana V, Inoue N, Oyamada M, Ohta A, Tachibana Y, Wijesekera DPH, Kuwamura M, Nishizawa Y, Itoh K, Izawa T, Hatoya S, Hasegawa T, Yamate J, Inaba T, Sugiura K. Development of effective tumor immunotherapy using a novel dendritic cell-targeting Toll-like receptor ligand. PLoS One. 2017 ;12(11):e0188738. doi:10.1371/journal.pone.0188738. eCollection 2017.

: 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 Dev. 2017;26(15):1111-1120. doi:10.1089/scd.2017.0026.

: Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Wijesekera DPH, Sanno K, Tanaka E, Sugiura K, Hiromitsu Tamada NK, Imai H, Inaba T. Feeder-independent canine induced pluripotent stem cells maintained under serum-free conditions. Mol Reprod Dev. 2017;84(4):329-339. doi: 10.1002/mrd.22789.

: Kanegi R, Hatoya S, Tsujimoto Y, Takenaka S, Nishimura T, Wijewardana V, Sugiura K, Takahashi M, Kawate N, Tamada H, Inaba T. Production of feline leukemia inhibitory factor with biological activity in Escherichia coli. Theriogenology. 2016;86(2):604-11. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.02.013.

: Tamada H, Adachi N, Kawate N, Inaba T, Hatoya S, Sawada T. Positive correlation between patency and mRNA levels for

cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in the uterine cervix of bitches with pyometra. J Vet Med Sci. 2016;78(3):525-8.

doi: 10.1292/jvms.15-0520.

: Tamada H, Takemoto K, Tominaga M, Kawate N, Takahashi M, Hatoya S, Matsuyama S, Inaba T, Sawada T. Expression and localization of epidermal growth factor, transforming growth factor- and epidermal growth factor receptor in the canine testis. J Reprod Dev. 2016;62(1):59-64.

doi: 10.1262/jrd.2015-079.

Hannan MA, Kawate N, Kubo Y, Pathirana IN, Bülllesbach EE, Hatoya S, Inaba T, Takahashi M, Tamada H. Expression analyses of insulin-like peptide 3, RXFP2, LH receptor, and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in testes of normal and cryptorchid dogs. Theriogenology. 2015 ;84(7):1176-84.

doi:10.1016/j.

: Ohta Y, Yoshida K, Kamiya S, Kawate N, Takahashi M, Inaba T, Hatoya S, Morii H, Takahashi K, Ito M, Ogawa H, Tamada H. Feeding hydroalcoholic extract powder of Lepidium meyenii (maca) increases serum testosterone concentration and enhances steroidogenic ability of Leydig cells in male rats. Andrologia. 2016 ;48(3):347-54. doi: 10.1111/and.12453.

[学会発表](計16件)

鳩谷晋吾

獣医師が行う再生医療研究～小・大動物臨床への応用から畜産・動物保護～「ネコ iPS 細胞作製の試み」

第17回日本再生医療学会総会(シンポジウム・招待講演)パシフィコ横浜・神奈川) 2018年3月21～23日

鳩谷晋吾

医学・獣医学における幹細胞を用いた内科治療のエビデンス

日本獣医再生医療学会 第13回年次大会(横浜ワールドポーターズ・神奈川) 2018年2月3～4日

塚本雅也、金城綾二、大高真奈美、西村健、中西真人、稲葉俊夫、杉浦喜久弥、鳩谷晋吾 臨床応用へ向けたイヌ iPS 細胞の効率的な作製

日本獣医再生医療学会 第13回年次大会(横浜ワールドポーターズ・神奈川) 2018年2月3～4日

塚本雅也、鳩谷晋吾、金城綾二、大高真奈美、西村健、中西真人、稲葉俊夫、杉浦喜久弥

Primed型およびNaive型イヌ iPS 細胞の効率的な作製方法の検討

第160回日本獣医学会学術集会(鹿児島大

学・鹿児島)2017年9月13~15日  
花房佳祐、MD、EMTIAJ ALAM、鳩谷晋吾、  
辻本恭典、玉田尋通、川手憲俊、稲葉俊夫、  
杉浦喜久弥  
ネコ精巢上体および卵巣における冷蔵保存  
法の検討  
第160回日本獣医学会学術集会(鹿児島大  
学・鹿児島)2017年9月13~15日  
鳩谷晋吾  
犬iPS細胞の基礎研究とその問題点  
第16回日本再生医療学会総会(シンポジウ  
ム・招待講演)(仙台国際センター・宮城)  
2017年3月7~9日  
鳩谷晋吾  
幹細胞療法適応の展望と課題  
日本獣医再生医療学会 第12回年次大会(名  
古屋プライムセントラルタワー・愛知)  
2017年2月11~12日  
鳩谷晋吾  
獣医再生医療における幹細胞の役割とは  
日本獣医再生医療学会 第12回年次大会(名  
古屋プライムセントラルタワー・愛知)  
2017年2月11~12日  
畦崎直哉、西村俊哉、金城綾二、Himali  
Wijesekera、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、川手憲  
俊、玉田尋通、今井裕、稲葉俊夫  
イヌ体細胞を用いた人工誘導胚体外内胚葉  
細胞の作製と肝細胞への分化誘導  
第159回日本獣医学会学術集会(日本大学・  
神奈川)2016年9月6~8日  
沖田良太、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、大高真  
奈美、西村健、中西真人、稲葉俊夫  
ネコiPS細胞株のセンダイウイルスベクター  
を用いた作製  
第159回日本獣医学会学術集会(日本大学・  
神奈川)2016年9月6~8日  
Uezaki Naoya, Nishimura Toshiya,  
Kanegi Ryoji, Wijesekera Daluthgamade  
Patsy Himali, Sugiura Kikuya, Hatoya  
Shingo, Kawate Noritoshi, Tamada  
Hironichi, Imai Hiroshi, Inaba Toshio  
Generation of multipotent canine  
extraembryonic endoderm-like cells via  
the formation of induced pluripotent stem  
cells.  
The International Society for Stem Cell  
Research 2016 Annual Meeting(サンフラン  
シスコ・アメリカ)2016年6月22~25日  
西村俊哉、田中恵里菜、鳩谷晋吾、金城綾  
二、Daluthgamage Pasty Himali Wijesekera、  
杉浦喜久弥、玉田尋通、川手憲俊、今井裕、  
稲葉俊夫  
イヌiPS細胞のマトリゲル上での培養と間  
葉系幹細胞への分化誘導  
第15回日本再生医療学会総会(大阪国際会  
議場・大阪)2016年3月17~19日  
鳩谷晋吾  
伴侶動物獣医療におけるESとiPS細胞の夢  
と現状  
第12回日本獣医内科学アカデミー学術大会

(パシフィコ横浜・神奈川)2016年2月21  
日  
鳩谷晋吾  
獣医再生医療の未来(ES、iPS細胞の基礎、  
基礎研究、臨床応用へ)  
日本獣医再生医療学会 第11回年次大会(ホ  
テルクライトン新大阪・大阪)2016年2月6  
日  
辻本恭典、鳩谷晋吾、金子武人、杉浦喜久  
弥、稲葉俊夫  
ネコの未成熟精子およびフリーズドライ精  
子による顕微授精  
第158回日本獣医学会学術集会(北里大学・  
青森)2015年9月7~9日  
Nishimura Toshiya, Kanegi Ryoji,  
Wijesekera Daluthgamage Patsy Himali,  
Sanno Kousuke, Tanaka Erina, Sugiura  
Kikuya, Hatoya Shingo, Kawate Noritoshi,  
Tamada Hironichi, Imai Hiroshi, Inaba  
Toshio  
FEEDER-INDEPENDENT AND SERUM-FREE CANINE  
INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS  
The International Society for Stem Cell  
Research (ISSCR) 2015 Annual Meeting(ス  
トックホルム・スウェーデン)2015年6月  
24~27日  
〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/cell/cel  
l.htm](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  
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  
竹中 重雄 (TAKENAKA Shigeo)  
大阪府立大学, 総合リハビリテーション  
学研究科, 教授  
研究者番号: 10280067  
(3)連携研究者  
中西 真人 (NAKANISHI, Mahito)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所,  
その他部局等, 研究員  
研究者番号: 10172355  
久末 正晴 (HISASUE Masaharu)  
麻布大学, 獣医学部, 准教授  
研究者番号: 80333144