

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19274

研究課題名（和文）イヌMuse細胞の分離と獣医再生医療への応用

研究課題名（英文）Isolation of multilineage-differentiating stress-enduring cells from canine adipose tissues and their application for veterinary regenerative medicine

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・客員教授

研究者番号：00137241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：イヌにおける再生医療用の新規の多能性幹細胞の探索を行い、イヌ脂肪組織由来間葉系幹細胞（ADSC）の中に、長時間の酵素処理に耐性があり、ヒトMultilineage-differentiating stress-enduring cell（Muse細胞）の特徴の一つとされている浮遊培養で胚様体に酷似したクラスターを形成する多能性幹細胞を見出した。本細胞は造腫瘍性が極めて低く、ADSCと比べ遊走能、分化能、免疫抑制能に優れていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトMuse細胞は体内に存在する多能性幹細胞であり、傷害組織に遊走してその組織の修復を行う能力を持つことから、ES細胞やiPS細胞と比べて臨床応用しやすいという利点を持っている。本研究では、ヒトと共通の生活習慣病などが自然発症するイヌのモデルを使い、イヌの脂肪組織からヒトMuse細胞と類似する特徴を持つ細胞を見出した。本細胞を用いた獣医領域における再生治療の有効性と安全性を確認することにより、ヒト再生医療にも有用な情報を提供するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to generate cells with high stem cell potency from canine adipose-derived stem cells (ADSCs) for veterinary regenerative medicine. After a long-term trypsin treatment, surviving cells which have similar properties as human multilineage-differentiating stress-enduring cells, formed cell clusters similar to embryoid bodies. Moreover, these cells showed little carcinogenetic potency, and significantly higher levels of transmigration activity and differentiation potential, and had stronger immunosuppressive activity than ADSCs. They are expected to be a promising tool for regenerative therapy in dogs.

研究分野：獣医学

キーワード：再生医療 多能性幹細胞 間葉系幹細胞 細胞ストレス トランスレーショナルリサーチ イヌ

## 1. 研究開始当初の背景

イヌはヒトと共通の生活習慣病などが自然発症する唯一の動物種であることから、疾病研究、臨床応用、実験モデル等に多くの需要がある。ヒト ES 細胞や iPS 細胞の多能性幹細胞の医療応用に際しては、未分化細胞の混入や造腫瘍性を有することから慎重なトランスレーショナル・リサーチが必要とされる。そのために、ヒトに近いモデルとなる動物実験の必要性から、研究代表者らは、これまでに、イヌ ES 細胞の分離・培養、およびイヌ iPS 細胞株の樹立を行い、両幹細胞を用いた獣医再生医療の可能性を検討してきた。さらに、体内の骨髄や脂肪などの間葉系組織に存在する間葉系幹細胞を用いて脊髄損傷イヌの運動機能の回復を促進させることに成功している (Am J Vet Res, 72(8), 1118-23, 2011; Vet Surg, 41(4), 437-42, 2012)。しかし、間葉系幹細胞は複数種の接着性細胞の集団であることから、細胞治療に用いるにはさらに純化した細胞が望まれている。

2010 年に成人ヒトの間葉系組織に多様な細胞に分化する能力を有する新たなタイプの多能性幹細胞である Multilineage-differentiating stress-enduring cell (Muse 細胞) が発見された (Kuroda et al., PNAS, 107(19), 8639-43, 2010)。本細胞の最大の特徴は、そもそも体内に自然に存在する細胞であり、腫瘍化の危険性が極めて低いことが挙げられている。一方、イヌについてはこの種の研究は、世界的にもいまだ見られない。

## 2. 研究の目的

本研究は、イヌのモデルを使い、未だ報告の見当たらないイヌの脂肪組織から Muse 細胞の分離・同定、および本細胞を用いた再生治療の有効性と安全性を確認することにより、獣医領域における新しい研究分野の再生医療を推し進めるとともに、ヒト再生医療の実現を早めることを目的とするものである。

## 3. 研究の方法

(1) イヌ Muse 細胞の分離：ヒト Muse 細胞は骨髄や脂肪組織等から分離されているが、その存在量は 1%以下とされている。イヌ脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) を 0.05%トリプシン溶液に 37 で 16 時間暴露して極度のストレスを与えることにより、Muse 細胞の分離を試みた。

(2) イヌのストレス耐性細胞の特性解析：

フローサイトメーターを用いて一般的な間葉系幹細胞の表面マーカーである CD44 および CD90 の確認、ヒト Muse 細胞マーカーである SSEA-3 の確認、および多能性幹細胞の未分化マーカーである SSEA-1 の確認、および PCR 法により SSEA-1 合成酵素の遺伝子発現量を調べた。

多能性幹細胞の特徴となる、CFU-F コロニー形成試験により自己増殖能、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性検出用キットを用いて ALP 活性の確認、免疫染色により未分化マーカーである SSEA-1、SSEA-3、NANOG、SOX2、OCT3/4、および TRA-1-60 の発現を確認した。

トリプシン処理による細胞への影響を確認するために染色体の核型解析を行った。

各種分化誘導培地を用いて多能性幹細胞が持つ三胚葉への分化能を検証した。

間葉系幹細胞が分化する能力の指標となる細胞糖鎖に結合するレクチンを調べた。

PCR 法により腫瘍化に関連するテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子を測定した。

細胞遊走能を評価した。

末梢血単核球との共培養により免疫調節能を調べた。

(3) 細胞培養キットの試作：獣医領域では幹細胞製品は医薬品と同じ扱いで、まだ製品として承認されたものはないことから、細胞製剤は院内にて調整する必要がある。培養に不慣れた獣医師でも安全で平易に培養可能であり、また高品質な細胞培養ができるような簡易型細胞培養キットの試作を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 市販のイヌ ADSC 培養キットを用いて作製したイヌ ADSC に、長時間に及ぶ極度のストレスを与えた結果、約 9%の残存細胞 (ストレス耐性細胞) を得ることができた。本ストレス耐性細胞を浮遊培養すると、ヒト Muse 細胞の特徴の一つとされている ES 細胞や iPS 細胞が形成する胚様体に酷似したクラスターを形成した (図 1)。

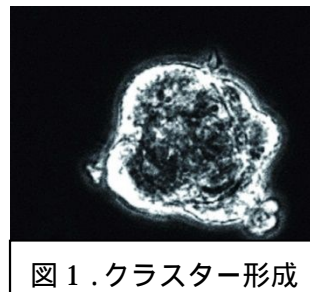


図 1. クラスター形成

(2) 接着培養したストレス耐性細胞と ADSC の細胞表面マーカーを比べたところ、両者ともに間葉系幹細胞マーカーの CD44 および CD90 に陽性を示し、一方、単球やマクロファージマーカーの CD14 および白血球マーカーの CD45 に陰性を示した。一方、ストレス耐性細胞の SSEA-1 合成酵素の遺伝子発現量や SSEA-1 の発現強度は ADSC のそれと比べて有意に高い値を示した。またヒト Muse 細胞マーカーの SSEA-3 については、両細胞の有意な差は認められなかった (図 2)。

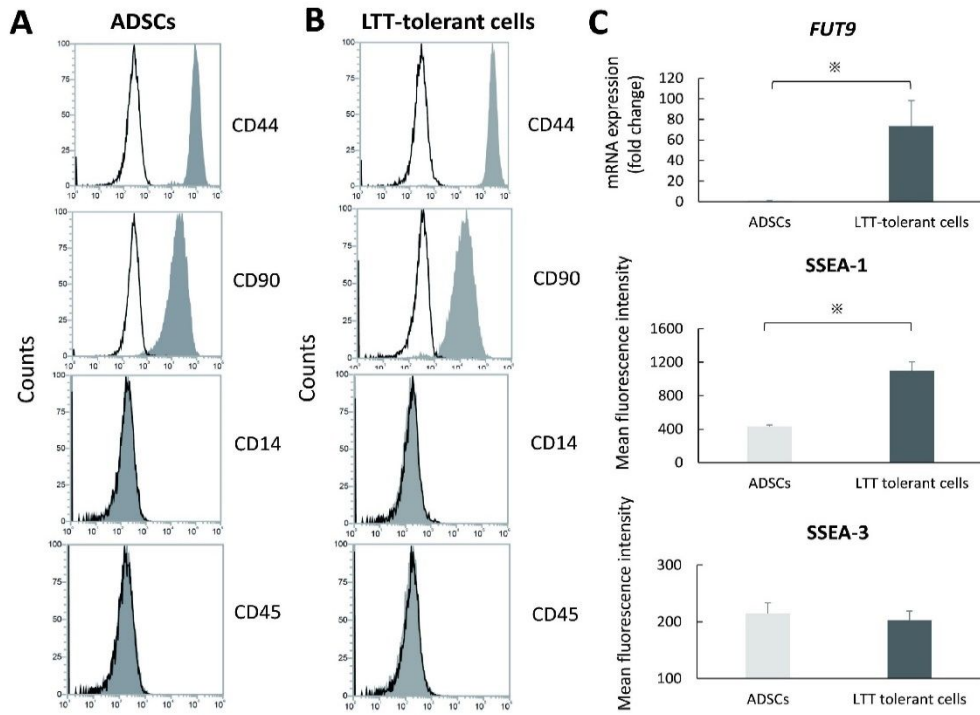


図 2 . ADSC とストレス耐性細胞の特性比較

(A) ADSC, (B) ストレス耐性細胞, (C) FUT9: SSEA-1 合成酵素の遺伝子

(3) ストレス耐性細胞の自己増殖能は ADSC のそれと比べて有意に高い値を示した (図 3A, B)

ストレス耐性細胞のクラスターの特性を解析した結果、多能性幹細胞のもつ特徴の一つであるアルカリホスファターゼ活性が陽性、および未分化マーカーである SSEA1、SSEA-3 および NANOG だけではなく、SOX2、OCT3/4 および TRA-1-60 についても免疫染色法にて陽性であった (図 3C, D)。

図 3 . 自己増殖能と多能性の評価

(A) コロニー形成試験, (B) 形成コロニー数, (C) アルカリホスファターゼ活性, (D) 未分化マーカー

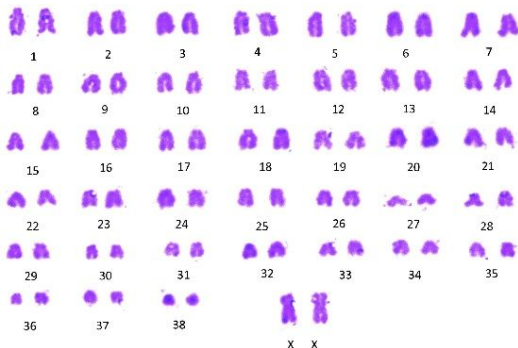
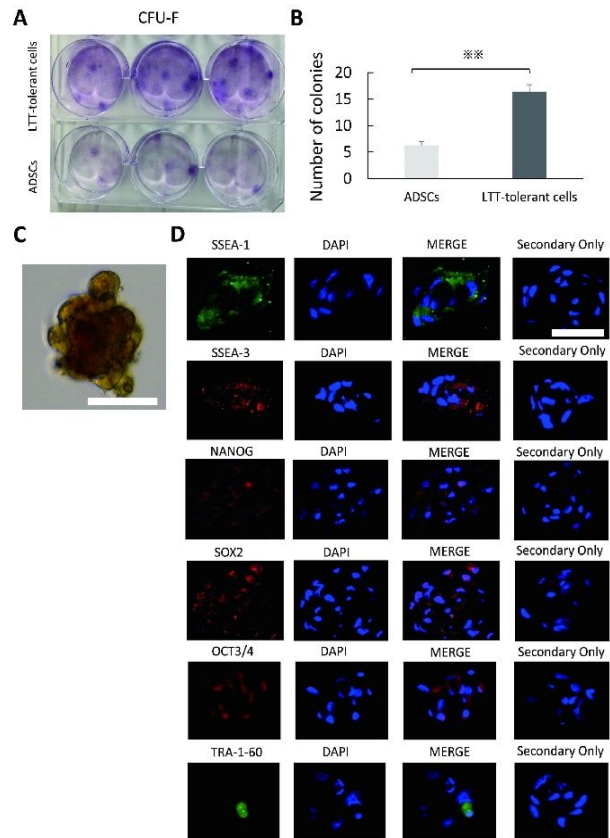


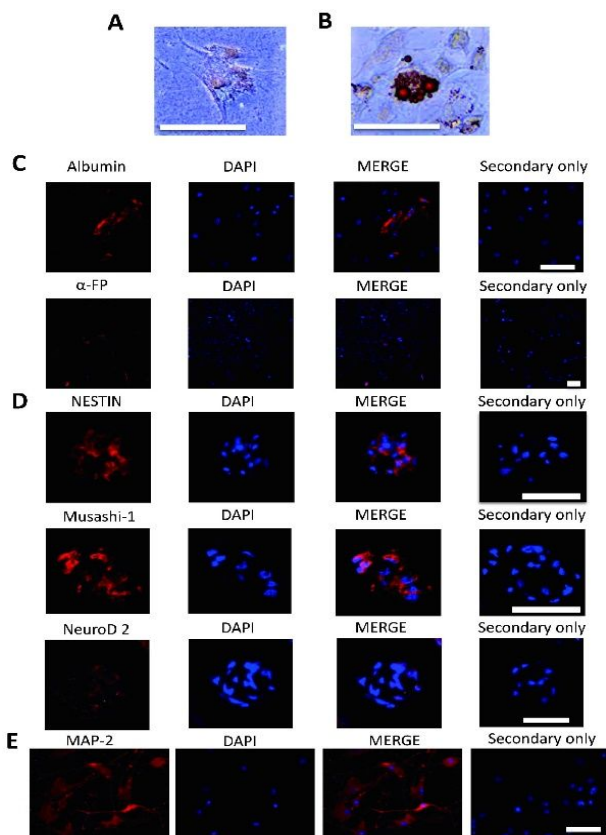
図 4 . 染色体の核型解析

(4) トリプシンによる細胞への影響を確認するためにストレス耐性細胞の核型解析を行ったところ、 $2n=78$  (XX 雌型) の正常染色体を示した (図 4)。



(5) ストレス耐性細胞を用いて、三胚葉への分化能の検証を行った。誘導培地を用いて分化誘導後の細胞は、脂肪・骨芽細胞(中胚葉)、肝細胞マーカーであるアルブミンおよび  $\alpha$ -フェトプロテイン(内胚葉)、神経幹細胞マーカーである NESTIN、Musashi-1、NeuroD2、および神経細胞マーカーである MAP-2(外胚葉)に陽性を示した(図5)。これらの結果から、ストレス耐性細胞は多能性幹細胞の持つ三胚葉への分化能を有していることが確認された。

図5. 三胚葉への分化能  
(A) 骨芽細胞, (B) 脂肪細胞, (C) ~ (E) 分化誘導後の免疫染色



(6) 2-6 シアル酸結合性レクチンを用いて分化能力を検証したところ、ストレス耐性細胞の分化能力は ADSC のそれよりも有意に高値を示した(図6A,B)。さらに、ストレス耐性細胞の骨分化能および脂肪分化能は ADSC のそれらよりも高いことが示された(図6C)。

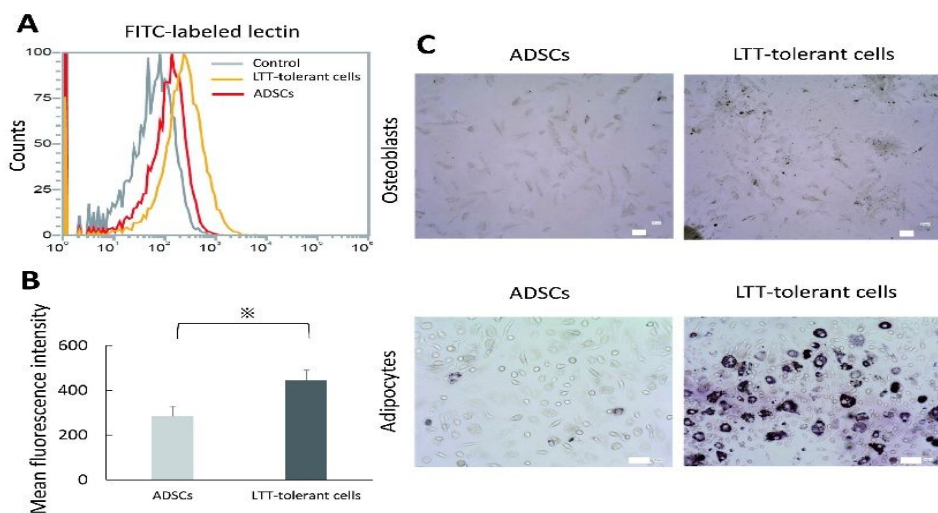
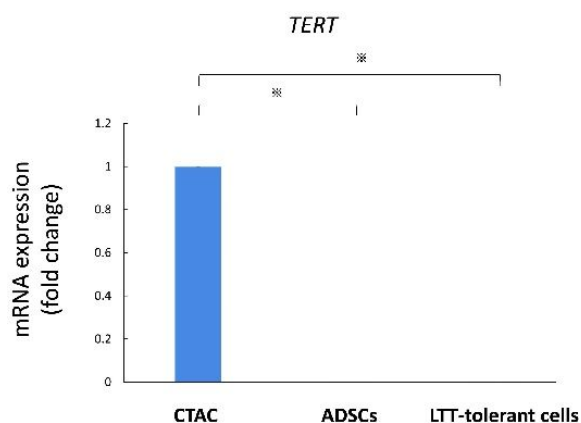


図6. レクチン結合による分化能力の評価と骨・脂肪分化  
(A) レクチン結合細胞, (B) レクチン結合強度, (C) 骨分化と脂肪分化

(7) ストレス耐性細胞における造腫瘍性と関連するテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子発現量はイヌ甲状腺がん細胞(CTAC)では高く、一方、ストレス耐性細胞および ADSC では有意に低値を示した(図7)。

図7. テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子発現量



(8) 遊走性因子として知られる S1P や SDF-1 に対して、ストレス耐性細胞の遊走能力は、ADSC のそれと比較して濃度依存的に有意に高値を示した(図 8A)。さらに遊走関連レセプターである S1PR2 や CXCR-4 の遺伝子発現量について調べたところ、ストレス耐性細胞は ADSC のそれと比べて有意に高値を示し、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) による刺激後も同様に高値を示した(図 8B)。

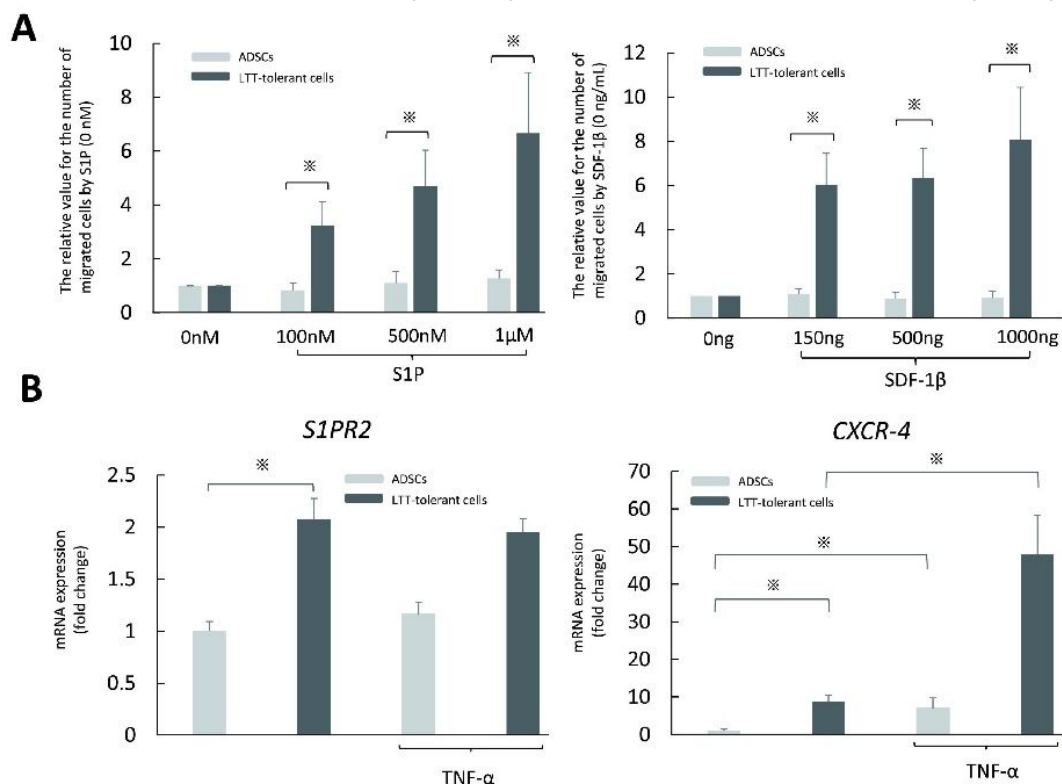


図 8 . 遊走能 (A) 遊走性因子, (B) 遊走関連レセプター

(9) 末梢血単核球 (PBMCs) との共培養によりリンパ球の増減割合を調べた結果、ストレス耐性細胞は ADSC よりもマイトジェン (PHA) で刺激されたリンパ球の増殖を有意に抑制した(図 9)。

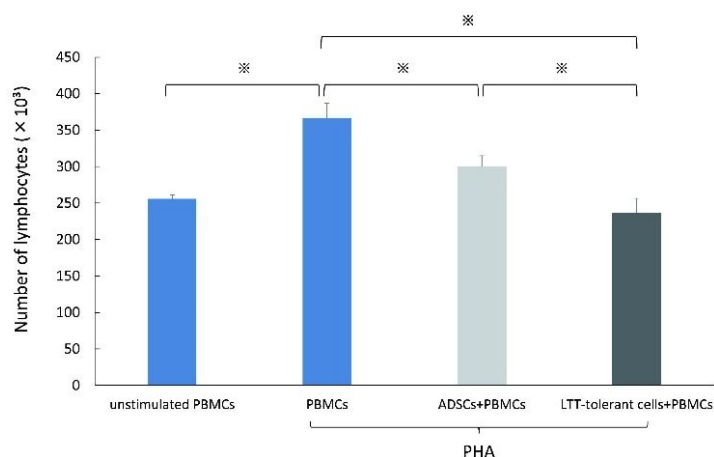


図 9 . リンパ球刺激試験

(10) 長時間トリプシン処理を施したイヌ脂肪組織から、市販のイヌ ADSC 培養キットを用いてストレス耐性細胞を簡易に分離培養できることがわかった。

以上、本研究では、市販の細胞培養キットを用いて分離培養したイヌ ADSC を、長時間トリプシンに暴露して極度のストレスを与えることにより、ヒト Muse 細胞の特徴の一つとされている浮遊培養で ES 細胞や iPS 細胞が形成する胚様体に酷似したクラスターを形成する細胞を見出した。本細胞は、in vitro において造腫瘍性が極めて低く、ADSC と比べ遊走能、分化能、免疫抑制能に優れていた。今後、本細胞を用いてイヌの重度脊髄損傷および慢性腎臓病など難治性疾患に対する臨床研究を推し進めていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsukamoto Masaya, Nishimura Toshiya, Yodoe Kyohei, Kanegi Ryoji, Tsujimoto Yasunori, Alam Md Emtiaj, Kuramochi Mizuki, Kuwamura Mitsuru, Ohtaka Manami, Nishimura Ken, Nakanishi Mahito, Inaba Toshio, Sugiura Kikuya, Hatoya Shingo	4. 巻 27
2. 論文標題 Generation of Footprint-Free Canine Induced Pluripotent Stem Cells Using Auto-Erasable Sendai Virus Vector	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 1577 ~ 1586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2018.0084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Alam Md. Emtiaj, Iwata Jun, Fujiki Kana, Tsujimoto Yasunori, Kanegi Ryoji, Kawate Noritoshi, Tamada Hiromichi, Inaba Toshio, Sugiura Kikuya, Hatoya Shingo	4. 巻 81
2. 論文標題 Feline embryo development in commercially available human media supplemented with fetal bovine serum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 629 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 TSUJIMOTO Yasunori, FUJIKI Kana, ALAM MD Emtiaj, TSUKAMOTO Masaya, AZUMA Rika, KANEGI Ryoji, ANZAI Masayuki, INABA Toshio, SUGIURA Kikuya, HATOYA Shingo	4. 巻 65
2. 論文標題 Development of feline embryos produced by Piezo-actuated intracytoplasmic sperm injection of elongated spermatids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 245 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsujimoto Yasunori, Fujiki Kana, Alam Md Emtiaj, Tsukamoto Mssaya, Azuma Rika, Kanegi Ryoji, Anzai Masayuki, Inaba Toshio, Sugiura Kikuya, Hatoya Shingo	4. 巻 147
2. 論文標題 Development of feline embryos produced using freeze-dried sperm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2020.02.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Michi, Nishida Hidetaka, Yoshizaki Karin, Akiyoshi Hideo, Hatoya Shingo, Sugiura Kikuya, Inaba Toshio	4. 巻 82
2. 論文標題 Canine mesenchymal stem/stromal cell-conditioned medium promotes survival and neurite outgrowth of neural stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 668 ~ 672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitani Kosuke, Ito Yuki, Takene Yukio, Hatoya Shingo, Sugiura Kikuya, Inaba Toshio	4. 巻 30
2. 論文標題 Long-Term Trypsin Treatment Promotes Stem Cell Potency of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 337 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2020.0175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 三谷康介、伊藤有紀、竹根幸生、Jiwoong Shin、Eui Man Jeong、Heun-Soo Kang、In-Gyu Kim、稲葉俊夫、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥
2. 発表標題 イヌおよびネコ間葉系幹細胞の分離とグルタチオン量のモニタリングによる品質評価
3. 学会等名 日本獣医再生医療学会 第14回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 MITANI Kosuke, ITO Yuki, TAKENE Yukio, JEONG Eui Man, KANG Heun-Soo, KIM In-Gyu, INABA Toshio, HATOYA Singo, SUGIURA Kikuya
2. 発表標題 Isolation and qualification of canine and feline mesenchymal stem cells by monitoring of glutathione levels
3. 学会等名 Tissue Engineering & Regenerative Medicine Exposition 2018 (TERMEX 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 TSUKAMOTO M, KANEKI Ryouji, NISHIMURA Toshiya, OHTAKA Mana, NISHIMURA Ken, NAKANISHI Mahito, INABA Toshio, SUGIURA Kikuya, HATOYA Singo
2. 発表標題 Induction of transgene free canine induced pluripotent stem cells by using Sendai virus vectors
3. 学会等名 The 5th TERMIS World Congress ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本雅也、西村俊哉、金城綾二、倉持瑞樹、桑村充、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
2. 発表標題 治療や病態解明へ応用可能なイヌiPS細胞の作製
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ALAM Md. Emtiaj、花房佳祐、鳩谷晋吾、辻本恭典、稲葉俊夫、杉浦喜久弥
2. 発表標題 Developmental competence of domestic cat oocytes from ovaries stored at various durations at 4 °C in different solutions
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川依理子、川手憲俊、稲葉俊夫、玉田尋通
2. 発表標題 イヌ精巣におけるステロイド産生関連因子遺伝子発現量の性成熟と加齢に伴う変化
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Laboratory of Cell Pathology  
<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/english/cell/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉浦 喜久弥  (SUGIURA Kikuya)  (30171143)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授   (24403)	
研究分担者	鳩谷 晋吾  (HATOYA Shingo)  (40453138)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授   (24403)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三谷 康介  (MITANI Kosuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

バングラデシュ	ラジシャヒ大学	農学部	獣医畜産学科	
---------	---------	-----	--------	--