

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658270

研究課題名(和文) 血液系細胞移植に向けたイヌ iPS 細胞から血液系細胞への効率的分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Generation of hematopoietic cells from canine induced pluripotent stem cells for cell transplantation

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) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：血液系細胞移植治療に向けて、イヌの人工多能性幹細胞(iPS細胞)から血液系細胞への効率的な分化誘導技術の開発を目的に検討し、以下の成果を得た。3つのイヌ造血サイトカイン遺伝子のクローニングおよびタンパク質を作製することができた。成犬皮膚線維芽細胞へ4つの多能性関連転写因子の導入により、iPS様細胞を得た。本細胞コロニーはアルカリフォスファターゼ活性陰性を示したが、24代継代することができた。ネコiPS細胞を複数の造血サイトカイン添加によって赤芽球へ分化誘導することができた。この方法をイヌiPS細胞に適用する予定である。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was in the development of the effective method for generation of hematopoietic cells from canine induced pluripotent stem (iPS) cells for cell transplantation, and the following results were obtained. We successfully cloned three canine hematopoietic cytokine genes and produced their proteins. We reprogrammed adult dog skin fibroblasts into iPS-like cells, using 4 transcription factors. While the cell colonies showed negative alkaline phosphatase activity, they were maintained until 24 passages. Erythroblasts could be induced from feline iPS cells, using several hematopoietic cytokines. This method will apply to canine iPS cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：再生医療 統合動物科学 iPS細胞 イヌ サイトカイン バイオテクノロジー トランスレーショナル
リサーチ

1. 研究開始当初の背景

血小板減少症は、イヌにおいてもよくみられる病態で、新鮮血小板の輸注以外は効果的な治療はなく、しかも、血小板は傷害され易く、寿命も短いため、血液から分離する方法では、持続的な対応は困難である。また、白血病や骨髄異形成症候群に対しては、造血幹細胞移植による治療が有効であるが、ヒトにおいてさえも適合ドナーを獲得するのが困難な現状である。一方、山中らによって開発された iPS 細胞は、体細胞に目的とする遺伝子を組み込むことによって幹細胞としての多能性および増殖性を獲得したものであり、もし、iPS 細胞から血液系細胞への効率的な分化誘導法を確立できれば、上記問題の解決に大きな前進をもたらす。

2. 研究の目的

本研究では、幹細胞成長因子 (SCF) あるいは血小板産生因子 (TPO) などの造血系への分化を誘導するサイトカインを作製し、それを iPS 細胞の分化誘導培養に用いることによって、iPS 細胞の血液系細胞への分化をより効率的に誘導することを目的に、以下の 3 項目について検討した。1) イヌ造血サイトカイン遺伝子のクローニングおよびベクターの作製、2) クローニングした遺伝子によって発現したタンパク質のサイトカイン活性の解析、3) イヌ iPS 細胞から血液細胞への迅速かつ効率的な分化誘導法の確立および治療への応用

3. 研究の方法

(1) イヌサイトカイン遺伝子のクローニング: 胚性幹細胞 (ES) 細胞から造血幹細胞 (HSC) を経て血小板への分化誘導に重要なサイトカインとして、SCF、顆粒球コロニ刺激因子 (G-CSF)、Flt3 リガンド、血管内皮成長因子 (VEGF)、TPO およびエリスロポエチン (EPO) が挙げられる。このうち TPO と EPO のイヌ遺伝子は、先行する研究においてすでにクローニング済であるので、本研究では、それ以外の上記サイトカイン遺伝子のクローニングを行った。既報のイヌ、ヒトあるいはマウス塩基配列をもとに設計したプライマーを用いて、骨髄細胞あるいは活性化させたイヌ末梢血 T 細胞から作製した cDNA ライブラリーの中の SCF、G-CSF、および Flt3 リガンドの cDNA を PCR によって増幅した。増幅後、cDNA を pCR-Blunt クローニングベクターに挿入し、DH5 コンピテントセルに形質転換して増殖させクローニングを行った。(2) クローニングした遺伝子の塩基配列をシーケンサーで解析し、既報の塩基配列のデータに照らして、目的のサイトカインをコードする cDNA のクローンを選択した。選択したクローンを哺乳類に発現可能な pcDNA 3.1/myc-His、pSVL などのプラスミドに挿入し、サイトカイン遺伝子の発現ベクターを作製した。2) クローニングした遺伝子によ

て発現したタンパク質のサイトカイン活性の解析: クローニングした両遺伝子を各々発現ベクターに挿入し、チャイニーズハムスター卵巣由来株である CHO 細胞に導入し、サイトカインタンパク質の発現をサイトカインに対する特異的抗体あるいは付随発現するタグエピトープに対する特異的抗体を用いて、フローサイトメトリーによって評価した。また、サイトカインとしての機能を骨髄細胞との共培養による造血コロニーの形成能により評価した。

(3) 成犬体細胞由来 iPS 細胞の作製: 成犬皮膚線維芽細胞にレンチウイルスを用いてヒト由来の 4 つの多能性関連転写遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4 および C-MYC) を導入し、イヌ iPS 細胞の作製を行った。

(4) iPS 細胞から血液系細胞への迅速かつ効率的な分化誘導法の確立: イヌ iPS 細胞の分化誘導の予備実験として、当教室で樹立したネコ iPS 細胞を用いて検討した。すなわち、ネコ iPS 細胞を浮遊培養して胚様体を形成させた。造血系への分化を誘導するサイトカインと胚様体を培養することによって、接着分子によるシグナルと液性因子によるシグナルを効果的に発生させ、iPS 細胞から血液系細胞への分化誘導を行った。

4. 研究成果

(1) 既報のイヌ G-CSF 遺伝子の塩基配列、あるいは SCF および fms-like tyrosine kinase

```

ACGAATTCACCATGAAGCTGACCGCCCTGCAG
CTGCTGCTGTGGCACAGCGCACTCTGGATGGT
GCAAGAAGCCGCCCCCTGGGCCCTACCGGCC
CCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCCTA
GAGCAAATGAGGAAGGTCCAGGCTGATGGCAC
GGCGCTGCAGGAGACTCTGTGTGCCACCCACC
AGCTGTGCCATCCTGAGGAGTTGGTGCTGCTC
GGGCACGCTCTGGGCATCCCCAGCCTCCCCT
GAGCAGCTGCTCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGA
TGGGCTGCCTGCGTCAACTCCACAGCGGCCTC
TTCCTCTACCAGGGCCTCCTGCAGGCCCTGGC
AGGGATATCCCCGAGTTAGCGCCACCTTGG
ACACACTGCAGCTGGACACCACCGACTTTGCC
ATCAACATCTGGCAGCAGATGGAAGATCTAGG
AATGCCCCCGCCGTGCCACCTACCCAGGGCA
CCATGCCAGCCTTCACCTCGGCCTCCAGCGC
CGGGCAGGAGGTGTCCTGGTGGCCTCCAACCT
GCAGAGCTTCTGGAGCTGGCATATCGCGCTC
TGCGCCACTTTGCCAAACCCGGATCCAC
    
```

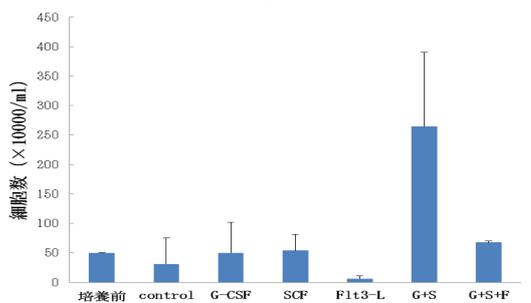
(図 1) イヌ G-CSF cDNA の塩基配列

3 ligand (Flt3-L) 遺伝子の細胞外領域の塩基配列をもとにプライマーを設計し、それぞれイヌT細胞、骨髓細胞、および末梢血単核球から抽出したcDNAをテンプレートとして、PCRにより、目的のcDNAを増幅し、クローニングを行った。G-CSFのクローニングにより、606bpのcDNAが得られた(図1)。本cDNAの塩基配列は既報のそれと比べて2塩基の相違が認められた。

SCFおよびFlt3-Lのクローニングにより、それぞれ573bpおよび555bpのcDNAが得られ、両cDNAの塩基配列は既報のそれらと全て一致していた。

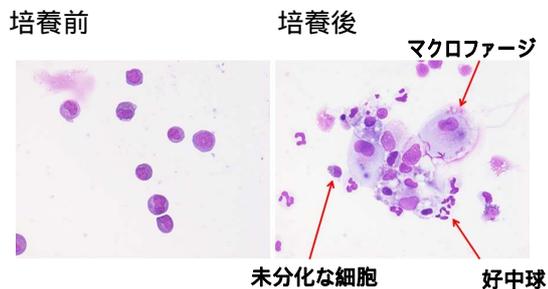
(2)リポフェクタミンを用いて作製遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣由来株であるCHO細胞に導入した。培養上清に含まれるG-CSFとSCFをイヌ骨髓細胞と培養し、それらが骨髓細胞の増殖および分化に与える影響を細胞数、形態学的特徴、表面マーカー、造血細胞コロニーの形成能によって評価した。

細胞数：図2に示すように、培養後の細胞数を測定したところ、G-CSFおよびSCFの2因子添加(G+S: G-CFS + SCF)の培養においてコントロールと比較して有意に細胞数が増加した。しかし、Flt3-Lも加えた3因子添加(G+S+F: G-CFS + SCF + Flt3-L)の培養においては、コントロールと比較して有意な差は認められなかった。

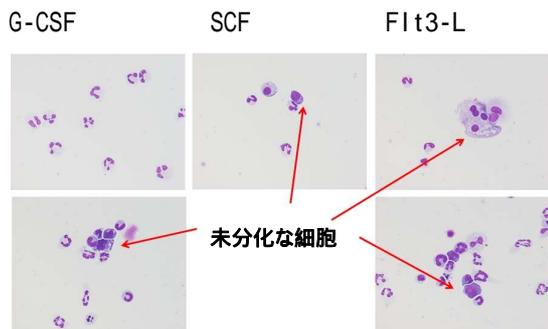


(図2) 作製因子を添加して10日間培養した後の細胞数

細胞形態：図3に示すように、ヘマカラー染色により培養前の細胞の形態を観察したところ、核の大きな未分化な前駆細胞が多数認められた。培養後10日の細胞の形態を観察すると、サイトカインを添加しない培地のみの培養(コントロール)では好中球やマクロファージ、未分化な細胞などさまざまな細胞が観察されたが、作製G-CSFのみで培養したものではほとんどの細胞が分葉した核を持つ好中球であり、それ以外の少数細胞はマクロファージであった(図4)。一方、作製SCF単独添加および作製Flt3-L単独添加の培養では、好中球やマクロファージの他に未分化な細胞も認められた。G-CSF + SCFおよびG-CSF + SCF + Flt3-Lの培養によっても好中球やマクロファージの他に、未分化な細胞が多く認められた。



(図3) 培養前後の細胞形態の変化

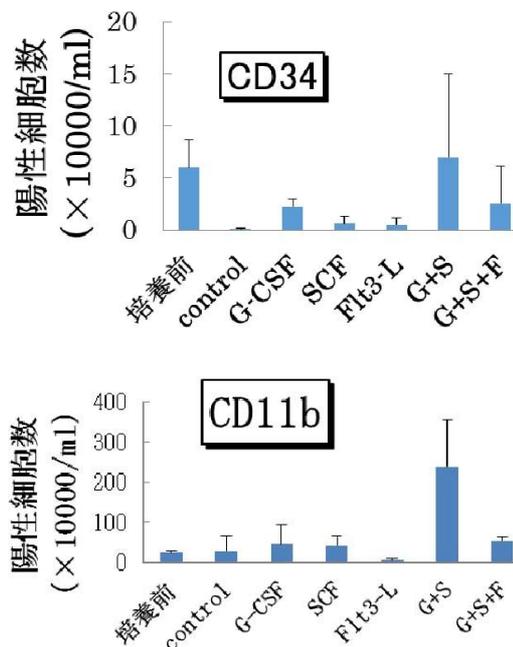


G + S G + S + F

(図4) 作製因子添加培養後の細胞形態

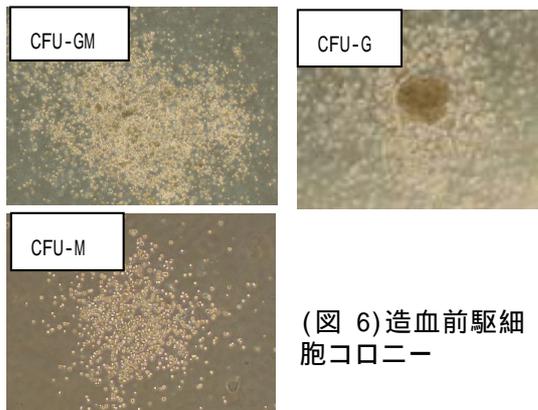
細胞表面マーカー 表面マーカーの発現を調べたところ、図5に示すように、造血幹細胞マーカーであるCD34を発現する(CD34+)細胞数は、コントロール、SCF単独およびFlt3-L単独添加の培養では、培養前と比較して有意に減少したが、G-CSF + SCFの培養では培養前のCD34+細胞の数を維持していた。

顆粒球・単球のマーカーであるCD11bを発現する細胞数はG-CSF + SCFの培養で有意に増加したが、Flt3-Lを添加することによってその増加は抑制された。



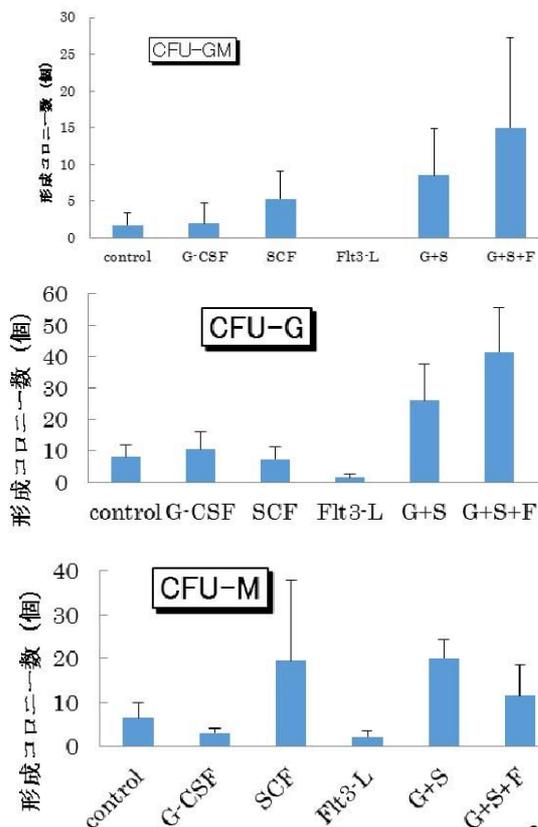
(図5) 細胞表面マーカー

造血コロニーの形成能：骨髓細胞をメチルセルロース培地で 14 日間培養して形成された顆粒球・マクロファージ系細胞 CFU-GM、顆粒球系細胞 CFU-G、およびマクロファージ系細胞のコロニー CFU-M を図 6 に示した。



(図 6) 造血前駆細胞コロニー

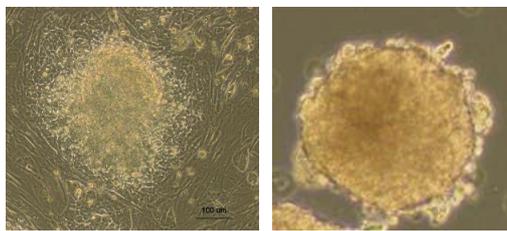
図 7 に示すように、顆粒球・マクロファージ系前駆細胞の形成するコロニー (CFU-GM) の数は、G-CSF + SCF の 2 因子の培養でコントロールと比較して増加する傾向を示し ($p=0.051$)、G-CSF + SCF + Flt3-L の 3 因子の添加によって有意に増加した。顆粒球系前駆細胞の形成するコロニー (CFU-G) の数は、G-CSF + SCF の培養でコントロールと比較して有意に増加した。Flt3-L 単独添加の培養では、コントロールと比較して有意に減少したが、Flt3-L を G-CSF + SCF とともに添加した培養では、G-CSF + SCF の培養と比較してさら



(図 7) 造血前駆細胞コロニーの形成能

に有意に増加した。マクロファージ系前駆細胞の形成するコロニー (CFU-M) の数は、コントロール群と比較して SCF のみの培養および G-CSF + SCF の培養で有意に増加したが、さらに Flt3-L を加えることによって増加が抑制された。

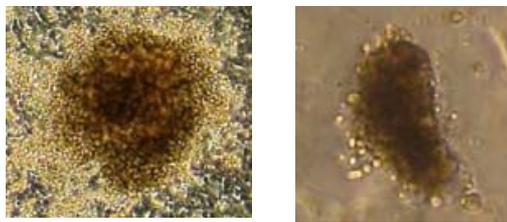
(3) 成犬皮膚線維芽細胞にレンチウイルスを用いてヒト由来の 4 つの多能性関連転写遺伝子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* および *C-MYC*) を導入し、ヒト白血病阻害因子と骨形成蛋白質 4 を添加した培地で培養した結果、iPS 様細胞コロニーを得た (図 7)。この細胞コロニーは、ヒトやマウスで報告されている iPS 細胞と同様に、高い核/細胞質比を示し、3~5 日間の浮遊培養により胚様体を形成した (図 8)。また、未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ染色には陰性を示したが、24 継代まで培養できた。さらに、MAP kinase 阻害剤と glycogen synthase kinase-3 阻害剤を添加した培地でイヌ iPS 細胞の作製を試みたが、細胞コロニーを得ることはできなかった。



(図 7) イヌ iPS 様細胞コロニー

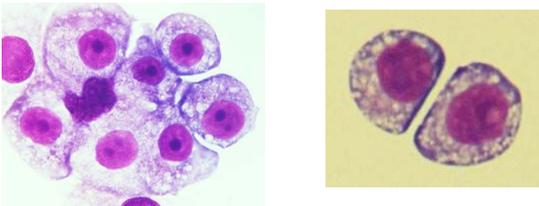
(図 8) 胚様体

(4) ネコ胎子線維芽細胞由来 iPS 細胞 (図 9) を用いて、浮遊培養で胚様体を形成させた後、血液分化培地に SCF などの造血系への分化を誘導する各種サイトカインを添加して 20~30 日間浮遊培養させた。得られた細胞を解離し、メチルセルロース培地で 10 日間培養することにより、赤血球系の造血前駆細胞コロ



(図 9) ネコ iPS 様細胞コロニー

(図 10) 赤血球系造血前駆細胞コロニー



(図 11) マクロファージ (図 11) 赤芽球系細胞系細胞

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(図 10)。

本コロニーにおいて、形態的にマクロファージ系細胞(図 11)と赤芽球系細胞(図 12)が確認できた。

本研究の結果より、イヌ造血サイトカイン遺伝子のクローニングおよびタンパク質の作製に成功した。さらに、これらのサイトカインを用いてネコ iPS 細胞から赤芽球系細胞への分化誘導にも成功したが、未分化状態および分化誘導効率の高いイヌ iPS 細胞の作製には、今後、塩基性線維芽細胞増殖因子等の他の添加因子を用いることも検討し、今回のネコ iPS 細胞を用いた分化誘導実験結果をイヌ iPS 細胞に反映させていく予定である。

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 5 件)

Nishida, H., Nakayama, M., Tanaka, H., Kamishina, H., Izawa, T., Hatoya, S., Sugiura, K., Suzuki, Y., Ide, C., Inaba, T. Evaluation of serum phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation. *Veterinary Surgery*, 査読有、43 巻、2014、289-293

DOI: 10.1111/j.1532-950X.2014.12144.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: 10.1262/jrd.2013-025

Wijewardana, V., Sugiura, K., Yahata, M., Akazawa, T., Wijesekera, D.P., Imamoto, S., Hatoya, S., Inoue, N., Inaba, T. Production of canine soluble CD40 ligand to induce maturation of monocyte derived dendritic cells for cancer immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 査読有、156 巻、2013、121-127
DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.09.016

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

〔学会発表〕(計 7 件)

Wijewardana, V., Sugiura, K., Akazawa, T., Wijesekera, D.-P.H., Imamoto, S., Inoue, N., Inaba, T. Improvement of dendritic cell-based immunotherapy for enhancing systemic immune responses against cancer, 第 42 回日本免疫学会学術集会、2013 年 12 月 12 日、千葉

因野 由衣子、西村 俊哉、西田 英高、鳩谷 晋吾、杉浦 喜久弥、川手 憲俊、高橋 正弘、玉田 尋通、稲葉 俊夫、イヌ iPS 細胞から神経系細胞への分化誘導培養系に及ぼす骨髄間質細胞の影響、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日、岐阜

古田 侑吾、川口 高正、南 直治郎、山田 雅保、稲葉 俊夫、今井 裕、イヌネコ体細胞を用いた人工多能性幹細胞の誘導、第 63 回関西畜産学会、2013 年 9 月 5 日、滋賀

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 15 日、米国ボストン

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. 2013 年 6 月 14 日、米国ボストン

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 日、岩手

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 日、岩手

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: イヌの iPS 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：25 年 2 月 22 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoindb.acs.osakafu-u.ac.jp/profile/out.cudjDYHfHMO.PEVGDxV-iw==.html>

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

杉浦 喜久弥 (SHUGIURA, Kikuya)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教
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・助教
研究者番号：40453138