

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659675

研究課題名(和文) イヌ iPS 細胞の樹立と疾患モデルイヌ研究への応用

研究課題名(英文) Establishment of canine iPS cells for the study of disease-model dogs

研究代表者

戸口田 淳也 (Toguchida, Junya)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40273502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：イヌ iPS 細胞の樹立を目指して、イヌ胎仔線維芽細胞にイヌのリプログラミング4因子を、EOSベクターを併用して導入し、内因性のOct3/4を発現することにより薬剤耐性を獲得しGFP蛍光を発するクローンを選択した。幹細胞マーカーの発現、胚様体形成能及び三胚葉分化マーカーの発現誘導が確認できたが、奇形腫形成能は確認できなかった。Chemically defined mediumを用いることで、短期間は未分化状態を維持した培養が可能であったが、長期培養では自然分化傾向が現れ、永続的に未分化状態を維持するクローンは樹立できず、更なる培養条件の探索が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To establish canine iPS cells, canine four reprogramming factor were introduced in to canine embryonic fibroblasts with the EOS vector system, which allowed us to select clones with the expression of endogenous Oct3/4 gene by drug-resistance and fluorescence of GFP. Selected clones were positive for stem cell marker genes and able to make embryoid bodies, which showed the induction of marker genes specific for each of three germ layers. Teratoma formation was, however, not observed. Using chemically defined medium, these clones were maintained at undifferentiated state during several passages, but the long term culture forced the spontaneous differentiation of these clones, and therefore no clones with the feature compatible with iPS cells were established. These data indicated that more investigation will be required to find the suitable culture condition for canine iPS cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：iPS細胞 イヌ

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞由来の分化細胞を用いた細胞治療を実現すべく、様々な領域で分化誘導法の確立が進められているが、臨床研究への移行のためには、動物を用いた前臨床試験が必須であり、特に長期にわたる有効性や、安全性の評価が重要視されている。そのため寿命や代謝動態を考慮すると齧歯類を用いた試験では不十分であり、中型動物による試験が必要となる。特にイヌは、これまで筋骨格系及び中枢末梢神経系の実験に永く用いられ、生理的な情報も蓄積されている点で至適な動物である。一方、iPS細胞の特性を生かした利用法として、疾患特異的 iPS細胞の樹立・応用がある。すなわち特定の疾患の罹患者の体細胞から iPS細胞を樹立し、病態の中心となっている細胞を誘導し in vitro で病態を再現することにより、発症にいたる過程を詳細に把握し、治療薬の開発等を目指す研究である。特に標的細胞を罹患患者より単離することが困難な神経疾患において iPS細胞を用いるアプローチは極めて有力なものとして推進されている。この利用法に関してもヒト病態と類似した自然発症モデルが存在しているイヌの応用が可能である。よく知られているものがヒト筋ジストロフィーと同一の遺伝子の異常による筋ジストロフィー、そして本研究で取り上げる ALS に類似した病態を呈する変性性脊髄症(Degenerative myelopathy、DM)イヌと血友病 A イヌがある。以上の背景から、イヌの iPS細胞を効率よく樹立し安定して維持できる方法を確立することは極めて意義のあるものと考えられる。

2. 研究の目的

正常ビーグル犬の体細胞から iPS細胞を効率よく樹立し、血清不含培地を用いて安定して培養維持できる技術を確立し、確立した樹立・培養方法を用いて、ALS モデルイヌ及び血友病 A モデルイヌからの iPS細胞樹立・培養を試み、開発した技術を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

イヌ体細胞としては、リプログラミング効率を考え、イヌ胎仔線維芽細胞(Canine embryonic fibroblast、CEF)を用いた。導入する遺伝子は我々が独自にクローニングしたイヌの 4 因子(Oct3/4、Sox2、Klf4 及び cMyc)及び Glis-1、Nanog 等を用いた。これらを EOS ベクターと共に導入した。EOS ベクターとは、リプログラミングが完全に起こった時に陽性となる Oct3/4 のプロモーターにより薬剤耐性遺伝子が発現す

るベクターであり、同時に GFP 遺伝子も発現するために蛍光による選択も可能なシステムである(図1)。

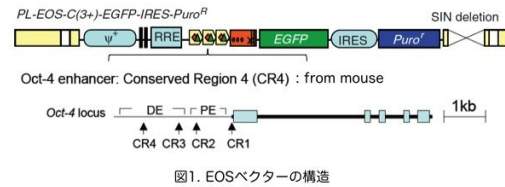


図1. EOSベクターの構造

導入後、薬剤(puromycin)耐性及び GFP 蛍光を指標として、完全にリプログラミングされたクローンを選択した。iPS細胞としての品質評価は、通常の未分化幹細胞マーカーの発現、細胞表面マーカーの発現、胚様体(Embryonic body、EB)形成能及び分化マーカー遺伝子の発現、更に奇形腫形成能により評価した。

4. 研究成果

EOS ベクターシステムを用いることにより、CEF より薬剤耐性及び GFP 蛍光を指標として複数のイヌ iPS細胞の候補クローンを樹立した。コロニーの形状は小型で、マウス iPS細胞に類似していた(図2)。

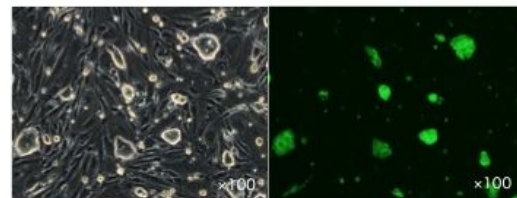


図2. イヌiPS細胞の形状(clone 509)

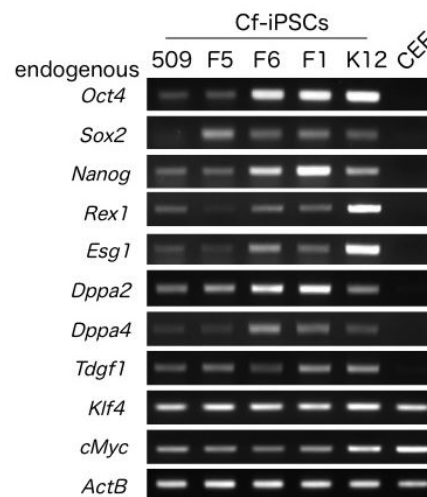


図3. 幹細胞マーカーの発現

各クローンは未分化幹細胞マーカー遺伝子を発現しており(図3)、胚様体形成能を有しており、三胚葉それぞれの分化マーカーの発現が誘導されることが確認できた(図4)。しかし免疫不全マウスへの移植による奇形腫形成能は確認できなかった。これらの

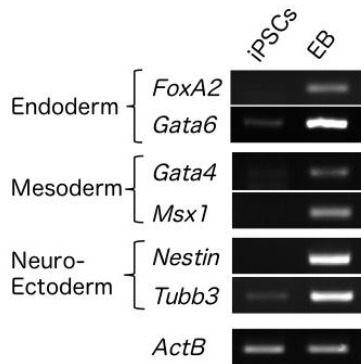


図4. EB形成による三胚葉関連遺伝子の発現

クローンは数回の継代中は、オリジナルの形状を維持していたが、その後自然分化の傾向が現れた。そこで安定した培養維持方法の開発に取り組み、血清を用いた数種類の培養条件を検討したが、いずれも未分化状態を維持することが困難であったため、血清を含まず、含有物の組成が判明している培地 (Chemically defined medium, CDM)を用いる方法に変更したところ、比較的安定して未分化状態が維持できるクローンの樹立に成功した。しかしその後の解析で、CDMを用いた培養系であっても長期に培養を継続すると、徐々に内因性幹細胞マーカー遺伝子の発現が減弱し、未分化状態を失い、自発的に分化する傾向があることが判明し、最終的に長期にわたって未分化状態を維持できるクローンは樹立できなかった。なぜ内因性の幹細胞遺伝子がサイレンシングを受けてしまうのかについて、いくつかの検討を行ったがその原因は解明できなかった。

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5件)

- 1) Kajiwaru M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012; 109(31): 12538-43. 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1209979109
- 2) Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida T, Shimizu K, Hara A, Yamada Y. EWS/ATF1 expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. J Clin Invest.

2013; 123(2): 600-10. 査読有. DOI: 10.1172/JCI63572

- 3) Hayakawa K, Ikeya M, Fukuta M, Woltjen K, Tamaki S, Takahara N, Kato T Jr, Sato S, Otsuka T, Toguchida J. Identification of target genes of synovial sarcoma-associated fusion oncoprotein using human pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2013; 432(4): 713-9. 査読有. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.003
- 4) Nasu A, Ikeya M, Yamamoto T, Watanabe A, Jin Y, Matsumoto Y, Hayakawa K, Amano N, Sato S, Osafune K, Aoyama T, Nakamura T, Kato T, Toguchida J. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. PLoS One. 2013; 8(1): e53771. 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0053771
- 5) Matsumoto Y, Hayashi Y, Schlieve CR, Ikeya M, Kim H, Nguyen TD, Sami S, Baba S, Barriet E, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Yamanaka S, Conklin BR, Toguchida J, Hsiao EC. Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. Orphanet J Rare Dis. 2013; 8(1): 190. 査読有. DOI: 10.1186/1750-1172-8-190

〔学会発表〕(計15件)

- 1) 松本佳久、池谷真、Edward Hsiao, Christopher Schlieve, 那須輝、浅香勲、大塚隆信、Bruce Conklin, 戸口田淳也。iPS細胞を用いた難治性骨疾患への取り組み。第11回日本再生医療学会総会(2012.6.13 横浜)
- 2) 横山宏司、池谷真、那須輝、田中孝之、斎藤潤、梅田雄嗣、西小森隆太、中畑龍俊、平家俊男、戸口田淳也。iPS細胞を用いたCINCA症候群の関節病変の解析。第11回日本再生医療学会総会(2012.6.13 横浜)
- 3) 那須輝、加藤友久、山本拓也、中村孝志、池谷真、戸口田淳也。同一ドナーの異なる組織より樹立したiPS細胞の比較検討。第11回日本再生医療学会総会(2012.6.13 横浜)
- 4) 早川和男、加藤友久、那須輝、池谷真、堀田秋津、大塚隆信、戸口田淳也。Generation of canine iPS cells and their characteristics.第11回日本再生医療学会

- 総会 (2012.6.13 横浜)
- 5) Matsumoto Y, Ikeya M, Hsiao E, Schlieve C, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Conklin B, Toguchida J. Application of iPS cells to the research of fibrodysplasia ossificans progressiva. 第 10 回 ISSCR (2012.6.15 横浜)
 - 6) Yokoyama K, Ikeya M, Nasu A, Tanaka T, Saito M, Umeda K, Nishikomori R, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 第 10 回 ISSCR (2012.6.15 横浜)
 - 7) Nasu A, Kato T, Yamamoto T, Ikeya M, Toguchida J. Genetically matched human iPS cells revealed that the propensity for iPS cells to differentiate into cartilage lineage cells differs with clones, but not cell type of origin. 第 10 回 ISSCR (2012.6.15 横浜)
 - 8) 早川和男、加藤友久、那須輝、池谷真、堀田秋津、大塚隆信、戸口田淳也。iPS 体細胞由来人工多能性幹細胞の樹立。第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2012.10.26 名古屋)
 - 9) 横山宏司、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、西小森隆太、中畑龍俊、平家俊男、戸口田淳也。罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明。第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2012.10.26 名古屋)
 - 10) 松本佳久、池谷真、Edward Hsiao、那須輝、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也。人工多能性幹細胞を用いた希少難治性骨疾患への取り組み。第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2012.10.26 名古屋)
 - 11) 松本佳久、池谷真、Edward Hsiao、那須輝、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也。人工多能性幹細胞を用いた希少難治性骨疾患への取り組み。第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3.22 横浜)
 - 12) 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男。罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明。第 34 回日本再生・炎症医学会(2013.7.3 京都)
 - 13) Matsumoto Y, Ikeya M, Hsiao E, Asaka I, Otsuka T, Toguchida J. Application of iPS

cells for rare and intractable diseases involving mesenchymal tissues. 第 8 回 Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies (2013.10.14 Venice)

- 14) 横山宏司、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、西小森隆太、中畑龍俊、平家俊男、戸口田淳也。罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の解明。第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.17 千葉)
- 15) 松本佳久、池谷真、Edward Hsiao、横山宏司、那須輝、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也。人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)を用いた希少難治性骨疾患への取り組み。第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.18 千葉)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：40273502

(2) 研究分担者

加藤 友久 (KATO TOMOHISA)
京都大学・再生医科学研究所・講師
研究者番号：50301247
池谷 真 (IKEYA MAKOTO)
京都大学・iPS 細胞研究所・准教授
研究者番号：20442923

(3) 連携研究者

井上 治久 (INOUE HARUHISA)
京都大学・iPS 細胞研究所・教授
研究者番号：70332327
松井 英人 (MATSUI HIDETO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00571027