

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292187

研究課題名(和文) 疾患特異的犬猫iPS細胞を用いた疾患発症機序の解明と臨床応用基盤技術の開発

研究課題名(英文) Attempt of generation of disease-specific iPS cells from dog/cat.

研究代表者

西野 光一郎 (NISHINO, KOICHIRO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90508144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床応用可能な犬猫のiPS細胞の樹立を目指し、様々な未分化関連遺伝子と培養添加物を組み合わせた260回におよぶ樹立実験を実施した。いくつかの条件で形質転換細胞を得たが、真に多分化能を維持するiPS細胞は樹立できなかった。網羅的メタボローム解析から犬猫の細胞では初期化時に極度の酸化ストレスを受け、リプログラミングの障害となっていることが明らかとなった。一方で、犬猫細胞からヒトiPS細胞の培養維持が可能なFeeder細胞の作出、マウスES細胞の培養維持が可能な犬LIFの作製に成功し、臨床応用に向けたiPS細胞の周辺技術基盤は整備できた。さらにネコグルタル酸尿症II型の遺伝子診断技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：Animal induced pluripotent stem cells (iPSCs) are required for veterinary regenerative medicine. Transformed cells appeared after introducing reprogramming factors into a dog or cat somatic cells, but they did not maintain pluripotency. Comparative metabolome analysis revealed that dog and cat cells were suffered extreme oxidative stress at the initiation of reprogramming. On the other hand, it is successful to make feeder cells from dog and cat somatic cells that can maintain pluripotency of human iPSCs. In addition, the genetic diagnosis of glutaric aciduria type II in cat was established.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ゲノム iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

マウス、ヒト iPS 細胞の樹立以来、医学、生物学分野において iPS 細胞の研究が盛んに行われている。獣医学領域においても医療技術の向上と伴侶動物の寿命延長に伴い、より高度な獣医療技術の創出が必要となっており、動物 iPS 細胞を用いた獣医療応用に大きな期待が寄せられている。一方でイヌやネコ、ウシなどは偏った交配によって不良形質の蓄積、つまり疾患原因遺伝子の濃縮を伴ってきた。このためヒトにおいて希少疾患といわれるものがある種の動物では高頻度に自然発症するケースが多い。イヌやネコの自然発症疾患は有用なヒト疾患モデルとして利用価値が高い。犬猫の iPS 細胞樹立法の確立は、獣医療における再生医療を可能にし、また疾患動物の *in vitro* モデルとして有用である。さらに疾患動物の iPS 細胞を用いた難病原因の解明、診断、治療法の技術基盤の確立は獣医療の発展ばかりでなく、前臨床試験的研究としてヒト医療応用への貢献度が非常に高い。しかし、真に多分化能を有し、臨床応用に可能なイヌやネコの iPS 細胞樹立法は確立していない。

2. 研究の目的

臨床応用可能な犬猫 iPS 細胞の樹立法の開発と疾患特異的犬猫 iPS 細胞を用いた疾患発症機序の解明、さらに臨床応用への周辺技術として、犬猫細胞を用いた Feeder 細胞の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 犬猫 iPS 細胞の樹立法の検討

ヒト iPS 細胞の樹立条件を基に、リプログラミング因子 (4~12 遺伝子の組み合わせ)、サイトカイン (8 種類の組み合わせ)、低分子化合物 (FGF 受容体阻害剤、MEK 阻害剤、GSK3 阻害剤、TGF β 受容体阻害剤の組み合わせ)、遺伝子導入法 (レトロウイルスベクター、エピソームベクター、PiggyBac ベクター) の多数の条件 30 通り以上を用い、イヌ、ネコ、ウシの間葉系細胞を用いた 260 回以上の樹立実験を行った。

(2) 網羅的メタボローム解析

レトロウイルスベクターを用いて *OCT-4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* 遺伝子をヒト、イヌ、ネコ、ウシの間葉系培養細胞に遺伝子導入し、細胞の抽出物を用いて CE-TOFMS 法により代謝物質の網羅的な検出および定量を行い、比較解析を行った。

(3) イヌ、ネコ、ウシ細胞由来 Feeder 細胞の開発

イヌ、ネコ、ウシの皮下脂肪を採取し、細胞を単離・培養してイヌ、ネコ、ウシ脂肪由来間葉系細胞株の樹立条件を確立した。この細胞を用いて、 γ 線による増殖停止条件やヒト

iPS 細胞培養による Feeder 細胞としての検定を行った。

(4) イヌ、ウシ Leukemia Inhibitory Factor (LIF) の作製と精製

イヌ、ウシ LIF 遺伝子を単離・同定し NIH3T3 細胞へ遺伝子導入を行った。イヌ、ウシ LIF 発現 NIH3T3 細胞を樹立し、細胞培養液上清からイヌ、ウシ LIF を精製し、マウス ES 細胞を用いて機能評価を行った。

(5) グルタル酸尿症 II 型の遺伝子診断技術の開発

グルタル酸尿症 II 型の原因遺伝子特定とされる *ETF α* 、*ETF β* 、*ETF β* 遺伝子について正常ネコ mRNA 全長配列を RACE 法を用いて決定し、グルタル酸尿症 II 型ネコとの配列比較から原因となる変異の同定をおこなった。

4. 研究成果

(1) 犬猫 iPS 細胞の樹立法の検討

導入遺伝子、サイトカイン、低分子化合物、遺伝子導入ベクターの様々な組み合わせの 260 回以上の樹立実験を行った結果、いくつかの条件において、遺伝子導入後 14-20 日後で明らかな形態変化を示した形質転換細胞を得ることができた (図 1)。

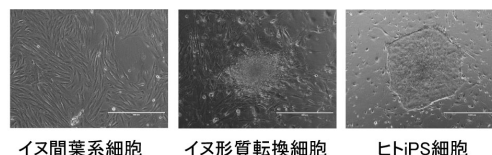


図1 イヌ形質転換細胞

(左)もともなったイヌ体細胞。(中)リプログラミング因子導入により得られたイヌ形質転換細胞。(右)同一条件により樹立されたヒトiPS細胞。

得られた形質転換細胞コロニーは ALP 活性および内在性 *OCT-4* 遺伝子の発現を不均一に認めしたが、増殖能が著しく低く、多分化能を示さなかった。同一の樹立条件によってヒト iPS 細胞は樹立が可能 (図 1 右) であることから、iPS 細胞への初期化過程において、動物種特異的のリプログラミング障害が存在することが示唆された。

(2) 網羅的メタボローム解析

イヌ、ネコ iPS 細胞作製の検討においてこれらの動物におけるリプログラミング障害の存在が示唆された。この障害の原因を解明することを目的として比較動物学的網羅的解析を検討した。マイクロアレイによる mRNA の比較解析を検討したが、イヌやネコのマイクロアレイは十分に開発されておらず、不適切と判断した。そこで動物種間で種差がほとんどないメタボライト (低分子代謝産物) の網羅的解析を行った。ヒト、イヌ、ネコ、ウシ体細胞にレトロウイルスベクターを用いて *OCT-4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* 遺伝子を導入し、CE-TOFMS 法により遺伝子導入後の細胞内に存在する低分子代謝物を網羅的に解析し

た。その結果、ヒトと比較して動物種ではアスコルビン酸や還元型グルタチオンなどの検出値が低く、酸化型グルタチオンは高い傾向を示した(図2)。このように、動物細胞では抗酸化物質が少なく、酸化物質が多い傾向が示され、酸化ストレスの影響を強く受け、iPS細胞へのリプログラミングが阻害されていることが示唆された。

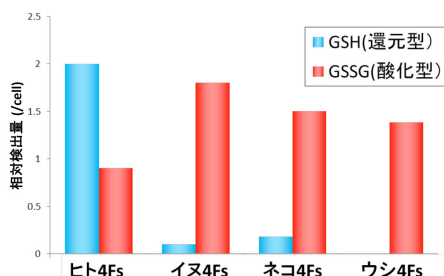


図2 グルタチオンの検出量の比較
リプログラミング初期において動物細胞では酸化ストレスの影響が大きい。

(3) イヌ、ネコ、ウシ細胞由来 Feeder 細胞の開発

イヌ、ネコ iPS 細胞の臨床応用実現には、周辺技術の開発も重要である。iPS 細胞の培養にはマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いた Feeder 細胞の使用が一般的であるが、臨床応用には異種動物成分の除去が課題となる。そこでイヌ、ネコ、ウシ細胞由来 Feeder 細胞の開発を試みた。イヌ、ネコ、ウシの皮下脂肪を採取し、細胞を単離・培養してイヌ、ネコ、ウシ脂肪由来間葉系細胞株を樹立した。これらの細胞を用いて γ 線の照射実験を行い、増殖を停止でき生存可能な至適 γ 線照射量を決定した。さらに Feeder 細胞としての機能評価として、ヒト iPS 細胞をそれぞれの細胞上に播種、培養を行った。その結果、イヌ細胞上ではヒト iPS 細胞は未分化を維持でき、イヌ Feeder 細胞の作製に成功した。ネコ細胞はヒト iPS 細胞を短期間であれば未分化維持することが可能であったが、7 日以上での培養では iPS 細胞の分化が観察された。ウシ細胞はヒト iPS 細胞を未分化維持できなかった(図3)。

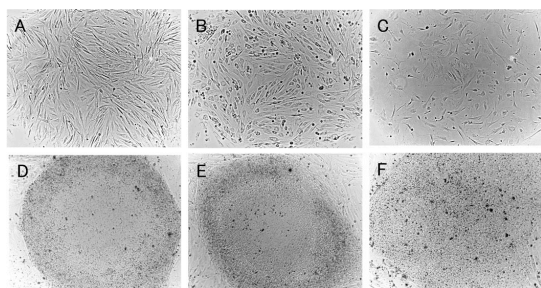


図3 イヌ、ネコ、ウシ細胞のFeeder細胞評価
(A) γ 線照射済みイヌ細胞。(B) γ 線照射済みネコ細胞。
(C) γ 線照射済みウシ細胞。
(D-F)各細胞上で7日間培養したヒトiPS細胞。(D) γ 線照射済みイヌ細胞。(E) γ 線照射済みネコ細胞。(F) γ 線照射済みウシ細胞。
イヌ細胞は未分化を維持できるが、ネコ細胞上ではヒトiPS細胞コロニーの周辺部が分化を始めている。ウシ細胞上では未分化ヒトiPS細胞コロニーを形成できなかった。

(4) イヌ、ウシ Leukemia Inhibitory Factor (LIF) の作製と精製

イヌ、ネコ iPS 細胞の臨床応用実現には、周辺技術の開発も重要であり、臨床応用には異種動物成分の除去が課題となる。そこでイヌ、ウシ LIF の作製を試みた。イヌ、ウシ LIF 遺伝子を単離・同定し、CAG プロモーター下に連結した強制発現ベクターを作製した。このイヌまたはウシ LIF 強制発現ベクターを NIH3T3 細胞へ遺伝子導入し、イヌ、ウシ LIF 発現 NIH3T3 細胞を樹立した。これらの細胞から培養液上清を得、イヌまたはウシ培養上清による未分化維持機能を評価するために、マウス ES 細胞の培養液へ添加し機能評価を行った。その結果、マウス ES 細胞を培養維持できるイヌおよびウシ LIF を得ることができた(図4)。

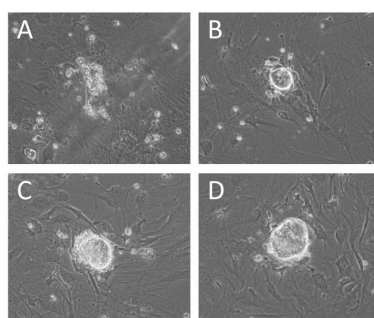


図4 イヌおよびウシLIFを用いたマウスES細胞の培養
(A) LIF無添加。コロニーが維持できない。
(B) ヒトLIF添加。(C) イヌLIF添加。(D) ウシLIF添加。

(5) グルタル酸尿症 II 型の遺伝子診断技術の開発

正常ネコ細胞から RNA を抽出し、RACE 法によってグルタル酸尿症 II 型の原因遺伝子特定とされる *ETF α* 、*ETF β* 、*ETFDH* 遺伝子の mRNA 全長配列を決定した。さらにグルタル酸尿症 II 型ネコとの 3 遺伝子の配列比較解析の結果、*ETFDH* 遺伝子に 1 塩基置換の点変異を同定した。この変異はヒトグルタル酸尿症 II 型では報告のないものであり、ネコ特異的な変異であることが示唆された。変異部位を同定したことで、今後のグルタル酸尿症 II 型ネコの遺伝子診断に有用な結果である。

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)

- ① Imai H, Kano K, Fujii W, Takasawa K, Wakitani S, Hiyama M, Nishino K, Kusakabe KT, Kiso Y. "Tetraploid Embryonic Stem Cells Maintain Pluripotency and Differentiation Potency into Three Germ Layers". *PLoS One* 10(6): e0130585. 2015. 査読有り
- ② Kaneko S, Bonasio R, Saldaña-Meyer R, Yoshida T, Son J, Nishino K, Umezawa

- A, Reinberg D. “Interactions between JARID2 and Noncoding RNAs Regulate PRC2 Recruitment to Chromatin”. *Mol Cell*. 53(2):290-300. 2014. 査読有り
- ③ Yamagata Y, Nishino K, Takaki E, Sato S, Maekawa R, Nakai A, Sugino N. “Genome-Wide DNA Methylation Profiling in Cultured Eutopic and Ectopic Endometrial Stromal Cells”. *PLoS One* 9(1): e83612. 2014. 査読有り
- ④ Wakitani S, Torisu S, Yoshino T, Hattanda K, Yamato O, Tasaki R, Fujita H, Nishino K. “Multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency (glutaric aciduria type II) with a novel mutation of electron transfer flavoprotein-dehydrogenase in a cat”. *JIMD Rep.* 13: 43-51. 2014. 査読有り
- ⑤ Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, Umezawa A, Kiyono T. “Non-canonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and iPS cells through ROCK activation” *Mol Cell Biol.* **33(22)**:4434-47. 2013. 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

- ① 西野光一郎
「多能性幹細胞とエピジェネティック・リプログラミング」
第 15 回日本再生医療学会総会シンポジウム 10「幹細胞・リプログラミング研究の新展開」
平成 28 年 3 月 17 日-19 日 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ② 直良拓朗・脇谷晶一・保田昌宏・鳥巢至道・西野光一郎
「ウシ及びイヌ間葉系細胞を用いたステロイドホルモン産生細胞へのダイレクトリプログラミング」
第 158 回 日本獣医学会学術集会
平成 27 年 9 月 7 日-9 日 北里大学 (青森県・十和田市)
- ③ 三木卓也・高澤建・脇谷晶一・阿久津英憲・梅澤明弘・西野光一郎
「ヒト iPS 細胞の Naive 型様への形質転換における未分化維持機構の解析」
第 158 回 日本獣医学会学術集会
平成 27 年 9 月 7 日-9 日 北里大学 (青森県・十和田市)
- ④ 西野光一郎
「ヒト iPS 細胞とエピジェネティクス」
第 33 回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム 1「培養細胞を用いた研究の新展開」平成 27 年 8 月 22 日-23 日 ホテルスカイタワー (宮城県・宮崎市)
- ⑤ 西野光一郎・豊田雅士・山崎-井上麻由・阿久津英憲・梅澤明弘
「ヒト iPS 細胞の異常メチル化領域の解析」
第 14 回 日本再生医療学会総会
平成 27 年 3 月 19 日-20 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑥ 温川恭至・西野光一郎・大野真一・中原知美・藤田雅俊・五島直樹・梅澤明弘・清野透
「新規 NOTCH-ROCK 経路はヒト上皮細胞と iPS 細胞の自己複製能を制限する」
第 73 回 日本癌学会学術総会
平成 26 年 9 月 25 日-27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑦ 向出直弘・脇谷晶一・西野光一郎
「多能性リプログラミング因子導入による代謝変動の比較動物学的解析」
第 157 回 日本獣医学会学術集会
平成 26 年 9 月 9 日-12 日 北海道大学 (北海道・札幌市)
- ⑧ 吉野大輝・脇谷晶一・鳥巢至道・八反田和寿・大和 修・田崎隆二・藤田春雄・西野光一郎
「ETFDH 遺伝子点変異によるグルタル酸尿症 II 型発症ネコの解析」
第 157 回 日本獣医学会学術集会
平成 26 年 9 月 9 日-12 日 北海道大学 (北海道・札幌市)
- ⑨ 西野光一郎・豊田雅士・山崎-井上麻由・阿久津英憲・梅澤明弘
「ヒト ES 細胞株間における異常 DNA メチル化領域の解析」
第 107 回 日本繁殖生物学会大会
平成 26 年 8 月 21 日-24 日 帯広畜産大学 (北海道・帯広市)
- ⑩ 三木卓也・脇谷晶一・阿久津英憲・梅澤明弘・西野光一郎
「ヒト iPS 細胞の状態遷移における DNA メチル化可変領域の解析」
第 8 回 日本エピジェネティクス研究会年会
平成 26 年 5 月 25 日-27 日 伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区)
- ⑪ 西野光一郎・豊田雅士・山崎-井上麻由・阿久津英憲・梅澤明弘
「ヒト ES 細胞の DNA メチル化バリエーション」
第 8 回 日本エピジェネティクス研究会年会
平成 26 年 5 月 25 日-27 日 伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区)
- ⑫ 長嶺知佳・脇谷晶一・西野光一郎
「ウシ脂肪組織由来間葉系細胞を用いた産業動物の分化誘導型 in vitro assay 系の開発」
第 156 回 日本獣医学会学術集会
平成 25 年 9 月 20 日-22 日 岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)
- ⑬ 西野光一郎・豊田雅士・山崎-井上麻由・阿久津英憲・梅澤明弘
「ヒト iPS 細胞の異常メチル化領域の解析」
第 7 回 日本エピジェネティクス研究会年会

平成 25 年 5 月 30 日-31 日 奈良県新公会
堂（奈良県・奈良市）

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

宮崎大学農学部獣医機能生化学研究室

http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/Vet_biochem/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 光一郎 (NISHINO KOICHIRO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90508144

(2) 研究分担者

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・副所長/再生医療センター長

研究者番号：70213486