

| | | |
|---------|--|--------|
| 称号及び氏名 | 博士(獣医学) | 塚本 雅也 |
| 学位授与の日付 | 2022年3月31日 | |
| 論文名 | Footprint-free で高品質なイヌ iPS 細胞の作製と 胚体内胚葉への誘導に関する研究 | |
| 論文審査委員 | 主査 | 杉浦 喜久弥 |
| | 副査 | 桑村 充 |
| | 副査 | 森山 光章 |
| | 副査 | 鳩谷 晋吾 |

論文要旨

緒言

多能性関連遺伝子を体細胞へ導入して作製する iPS 細胞は、自己複製能と多分化能をもち、ヒト再生医療へ応用されている。また、遺伝性疾患患者由来 iPS 細胞は、病態再現を介して、病態解明および創薬研究に有用である。一方、獣医療でも応用を目指し、イヌ iPS 細胞が多く作製されてきた。しかし、それらは宿主細胞ゲノムを傷害するウイルスベクターで作製され、細胞のがん化など安全性に問題があった。また、既報のイヌ iPS 細胞は、ヒトやマウスで iPS 細胞としての必須条件であるテラトーマ形成能をもたず、品質にも問題があった。そのため、安全性が高く高品質なイヌ iPS 細胞の作製が求められている。

センダイウイルスベクターは宿主細胞質内で複製・転写・翻訳が行われ、細胞からの除去が可能である。このため、宿主細胞ゲノムへの傷害がない Footprint-free な iPS 細胞作製手法として、ヒトで用いられている。また、体細胞の効率的な初期化には、複数の多能性関連遺伝子がバランスよく発現する必要がある。センダイウイルスベクターは、複数の遺伝子をひとつのベクターに搭載可能で、高品質な iPS 細胞を安定的に作製できる。

一方、犬炎症性腸疾患は遺伝的背景などが病因として挙げられるが、詳細な発症機序は不明である。炎症性腸疾患の罹患犬に由来する iPS 細胞を消化管組織へ誘導することで、その病態解明に応用できると考えられる。ヒト消化管組

織は、iPS 細胞から胚体内胚葉 (definitive endoderm: DE) を介して誘導される。しかし、イヌ iPS 細胞からの DE 誘導方法は明らかではない。

そこで本研究では、センダイウイルスベクターを使用して、Footprint-free で高品質なイヌ iPS 細胞作製を試みた。また、イヌ iPS 細胞からの DE 誘導方法を検討した。

第一章 センダイウイルスベクターを用いたイヌ iPS 細胞作製

センダイウイルスベクターである SeVdp(KOSM)302L は、ヒト *KLF4*、*OCT3/4*、*SOX2*、*C-MYC* (4 因子) を導入できる。また、iPS 細胞で発現する microRNA-302 により複製が阻害され、自動的に除去される。本章では SeVdp(KOSM)302L を用いたイヌ iPS 細胞作製を試みた。

● 第一節 イヌ胎子線維芽細胞からの iPS 細胞作製

イヌ胎子線維芽細胞 (canine embryonic fibroblasts: CEF) へ SeVdp(KOSM)302L によりヒト 4 因子を導入した。その後、マウス胎子線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts: MEF) 上へ再播種し、iPS 細胞用培地で培養した。その結果、初代 iPS 細胞コロニーが得られ、初期化効率は 0.02% であった。RT-PCR でベクターの除去が確認された 2 つのイヌ iPS 細胞株は、未分化マーカーを発現しており、胚葉体形成後は三胚葉マーカーを発現した。また、免疫不全マウスの精巣被膜下へ移植後、本イヌ iPS 細胞はテラトーマを形成した。さらに核型解析により、正常核型を示した。

以上より、SeVdp(KOSM)302L を用いて、CEF から Footprint-free で高品質な iPS 細胞を作製した。

● 第二節 イヌ末梢血単核球からの iPS 細胞作製

採血で分離可能なイヌ末梢血単核球へ SeVdp(KOSM)302L によりヒト 4 因子を導入した。MEF 上へ再播種し、iPS 細胞用培地で培養を続けた。その結果、ベクターが除去された 1 つのイヌ iPS 細胞株を得た。本イヌ iPS 細胞は未分化性と *in vitro* での多分化能を有していたが、テラトーマ形成能をもたなかった。

以上より、SeVdp(KOSM)302L を用いてイヌ末梢血単核球から Footprint-free な iPS 細胞を作製した。しかし、高品質なイヌ iPS 細胞作製には、さらなる条件検討の必要性が示唆された。

第二章 ステルス型センダイウイルスベクターを用いたイヌ iPS 細胞作製

ステルス型センダイウイルスベクター (stealth RNA vector: SRV) は、従来のセンダイウイルスの免疫源性を軽減したもので、効率的にヒト体細胞を初期化できる。生物種特異的な多能性関連遺伝子の導入や、上述の 4 因子に *LIN28* と *NANOG* を追加した 6 因子導入も、効率的な初期化に有用である。また、初期化を促進する低分子化合物と無血清 iPS 細胞培地の StemFit が、イヌ末梢血単

核球からの高品質な iPS 細胞作製に有用である。本章ではイヌ 6 因子を搭載した SRV と低分子化合物、StemFit を用いてイヌ iPS 細胞作製を試みた。

● 第一節 イヌ線維芽細胞からの iPS 細胞作製

2 種類の SRV (159cf と 162cf) で CEF および成犬線維芽細胞 (canine dermal fibroblasts: CDF) へイヌ 6 因子を導入した。MEF 上へ再播種後、CEF には MEK 阻害剤、GSK3 β 阻害剤、TGF β 阻害剤および Rock 阻害剤 (4 small molecules: 4SM) を、CDF には 4SM に加えてアスコルビン酸、フォルスコリン (6 small molecules: 6SM) を添加した N2B27 培地で 4 日間培養した。その後、StemFit で培養すると、CEF から初代 iPS 細胞コロニーが複数得られた。159cf と 162cf 使用時の初期化効率は、0.120% と 0.187% であった。また CDF からも複数の初代コロニーを得た。siRNA 処理を経て SRV が除去された iPS 細胞は未分化性、*in vitro* での多分化能および正常核型を有していた。さらに、複数のイヌ iPS 細胞はテラトーマ形成能を有していた。

以上より、SRV でイヌ 6 因子を導入し、低分子化合物と StemFit を使用して、イヌ線維芽細胞から Footprint-free で高品質な iPS 細胞を効率よく作製した。

● 第二節 イヌ尿由来細胞からの iPS 細胞作製

尿から分離したイヌ尿由来細胞 (urine derived cells: UC) へ SRV によりイヌ 6 因子を導入した。CDF と同様の条件で初期化すると、初代 iPS 細胞コロニーを多数得た。159cf と 162cf 使用時の初期化効率は、最大で 1.58% と 2.43% であり非常に高かった。siRNA 処理を経て SRV が除去されたイヌ iPS 細胞は未分化性、*in vitro* での多分化能、テラトーマ形成能および正常核型を有していた。

以上より、SRV によりイヌ 6 因子を導入し、6SM と StemFit を使用して、イヌ UC から Footprint-free で高品質な iPS 細胞を非常に効率よく作製した。

● 第三節 Feeder-free 条件でのイヌ iPS 細胞作製

MEF などの異種由来成分は、生体投与時に未知の感染症や免疫拒絶のリスクを増加させる。そこで、MEF を使用しない Feeder-free 条件下でイヌ iPS 細胞を作製した。Feeder-free 培養システムである DEF-CS を用いて、イヌ 6 因子導入 CEF およびイヌ UC を培養した。その結果、複数の初代 iPS 細胞コロニーが得られた。siRNA 処理を経て SRV が除去された iPS 細胞は未分化性、*in vitro* での多分化能を有していた。さらに、CEF 由来 iPS 細胞はテラトーマ形成能と正常核型を有していた。

以上から、SRV でのイヌ 6 因子導入により、Feeder-free 条件下でもイヌ iPS 細胞を作製した。

第三章 イヌ iPS 細胞から胚体内胚葉への分化誘導法の検討

ヒトで DE 分化に使用される高濃度 Activin A を用いて、イヌ iPS 細胞から DE を誘導した。Matrigel をコートした培養皿上へ、イヌ iPS 細胞を $1.0 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ で播種した。48 時間後から、100 ng/mL Activin A と FBS を含む DE

分化培地で3日間培養した。その結果、 $1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ で播種時、イヌ iPS 細胞は敷石状へ形態変化し、フローサイトメトリ解析および免疫染色で DE マーカーを発現した。また DE 誘導時の培養期間および播種細胞密度を検討した結果、96 時間培養および $5.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ の播種密度で DE 誘導効率が高かった。続いて $5.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ で播種したイヌ iPS 細胞を Matrigel でサンドイッチ培養した後、96 時間 DE を誘導した。その結果、免疫染色で OCT3/4 陽性細胞が減少した。さらに、FBS を血清代替物 (Knockout serum replacement: KSR) に変更すると、DE 誘導効率は 64.32% に向上した。

以上より、至適密度で播種したイヌ iPS 細胞を Matrigel でサンドイッチ培養後、KSR 添加 DE 分化培地で培養することにより、効率的に DE を誘導した。

総括

1. SeVdp(KOSM)302L を用いたヒト 4 因子導入により、CEF から Footprint-free で高品質な iPS 細胞を作製できる。
2. 1.と同様の方法で、イヌ末梢血単核球から Footprint-free な iPS 細胞を作製できる。しかし、そのイヌ iPS 細胞はテラトーマ形成能をもたず、低品質である。
3. SRV を用いてイヌ 6 因子を導入し、4SM または 6SM と StemFit を用いることで、CEF と CDF から Footprint-free で高品質な iPS 細胞を効率よく作製できる。
4. 3.と同様の方法で、イヌ UC から Footprint-free で高品質な iPS 細胞を非常に効率よく作製できる。
5. SRV を用いたイヌ 6 因子導入により、CEF とイヌ UC から Feeder-free 条件下で iPS 細胞を作製できる。
6. 至適密度で播種したイヌ iPS 細胞を Matrigel でサンドイッチ培養後、KSR 添加 DE 分化培地で培養することにより、効率的に DE を誘導できる。

審査結果の要旨

iPS 細胞は、複数の多能性関連遺伝子を体細胞へ導入して作製され、ES 細胞と同様に自己複製能と多分化能をもつ。そのため、ヒトで再生医療や疾患の病態解明などへ応用されている。獣医療においても、レトロウイルスベクターでヒト多能性関連遺伝子である *KLF4*、*OCT3/4*、*SOX2*、*C-MYC* (4 因子) を導入してイヌ iPS 細胞が作製されてきた。しかし、導入遺伝子が宿主細胞のゲノム中に残されるため、細胞のがん化を誘発する恐れがある。よって、安全性を保証するためには、残存遺伝子のない Footprint-free な iPS 細胞を作製する必要がある。

ある。また、iPS 細胞の品質評価に重要な高い分化能力は、免疫不全マウスにおけるテラトーマ形成能によって示される。しかし、既報のイヌ iPS 細胞はテラトーマを形成出来ていない。この原因として、1 つの遺伝子しか搭載できないレトロウイルスベクターでは、それぞれの多能性関連遺伝子が体細胞の初期化に適したバランスで導入されないためと考えられる。センダイウイルスベクターは、宿主細胞質内で複製・転写・翻訳が行われ、microRNA や siRNA により細胞内からの除去が可能である。このため、宿主細胞中に残存遺伝子がない Footprint-free な iPS 細胞を作製できる。また、複数の遺伝子をひとつのベクターに搭載可能なため、複数の多能性関連遺伝子をバランスよく発現させることができる。

一方、内胚葉組織は生体内で重要な機能を担うため、内胚葉組織の疾患に対して、イヌでも iPS 細胞を用いた再生医療への応用が期待される。ヒトでは、内胚葉組織は iPS 細胞から胚体内胚葉を介して誘導される。しかし、イヌ iPS 細胞からの胚体内胚葉への誘導方法は確立されていない。

そこで、本研究では、センダイウイルスベクターを用いて、Footprint-free で高品質なイヌ iPS 細胞の作製を試み、また、イヌ胚体内胚葉への誘導方法を検討している。

第 1 章では、センダイウイルスベクターの 1 つである SeVdp(KOSM)302L を用いて iPS 細胞の作製を試みている。本ベクターは、多能性幹細胞に発現する microRNA-302 によって複製が阻害されるため、iPS 細胞から自動的に消去される。本ベクターによって多能性関連遺伝子であるヒトの 4 因子をイヌ胎子線維芽細胞に導入して iPS 細胞の作製を試みたところ、初期化効率 (0.02%) は、レトロウイルスベクターを使った既報 (0.0007%) と比べて高く、樹立した iPS 細胞は、Footprint-free であり、未分化マーカーを発現し、*in vitro* で三胚葉への分化能を示すのみでなく、テラトーマ形成能を持つことを認めている。しかし、胎子線維芽細胞に代わって、末梢血単核球を用いて同様な処置を行ったところ、樹立した iPS 細胞は Footprint-free であったが、テラトーマ形成能を持たず、より効果的な iPS 細胞の作製方法の検討が必要であると考察している。

第 2 章では、イヌ体細胞から Footprint-free で高品質の iPS 細胞を作製するためのより効果的な方法を検討している。すなわち、免疫原性を軽減したステルス型センダイウイルスを用い、導入遺伝子をヒトからイヌ遺伝子に代え、さらに 4 因子に *LIN28A* と *NANOG* を加えた 6 因子を導入している。また、培養に無血清培地を用い、初期化を促進する低分子化合物を添加している。本方法によって、イヌ胎子線維芽細胞ではより高い初期化効率 (0.120~0.187%) を得ており、成犬線維芽細胞でも初期化が認められている。作製された iPS 細胞は、siRNA 処理によって Footprint-free となり、それらはテラトーマ形成能を持つことを認めている。また、簡便に採取可能な尿由来細胞を同方法で処置したところ、

Footprint-free な iPS 細胞が作製でき、それらはテラトーマを形成することを認めている。さらに、Feeder free の条件下でも胎子線維芽細胞と尿由来細胞を用いて同様な結果を得ている。以上の結果から、ステルス型センダイウイルスを用いてイヌ 6 因子を導入する方法により Footprint-free で高品質なイヌ iPS 細胞が作製できることを明らかにしている。

第 3 章では、iPS 細胞から胚体内胚葉への分化誘導法を検討している。イヌ iPS 細胞を Matrigel 上で Activin A とともに培養することにより、胚体内胚葉細胞の特徴である敷石状の形態を持ち、CXCL4/c-kit を共発現し、FOXA2 および SOX17 を発現する細胞を認め、イヌ iPS 細胞から胚体内胚葉へ分化誘導できることを明らかにしている。さらに、 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ の播種密度で、Knockout serum replacement を用いて Matrigel 中で 96 時間三次元培養することにより、最も効率的に分化誘導できることも明らかにしている。

以上、本研究の成果は、小動物医療の発展に有用であるだけでなく、臨床獣医学の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。