

称号及び氏名	博士（獣医学）	金城 綾二
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	ネコ iPS 細胞と関連タンパク質 LIF の作製に関する研究	
論文審査委員	主査	稲葉 俊夫
	副査	玉田 尋通
	副査	中村 洋一
	副査	鳩谷 晋吾

論文要旨

・緒言

ネコは伴侶動物として広く飼育されており、小動物臨床における主要な診療対象の一つとなっている。近年、獣医療の進歩や飼育環境の向上に伴ってその寿命は大きく延長している。一方で、ネコにおいてもヒトと同様に糖尿病、慢性腎臓病など「生活の質」を大きく低下させる疾患や、さらに、品種・血統に関連する遺伝性疾患の研究・治療が課題となっている。これらの疾患に対しては手術・投薬など従来の手法では治療困難とされており、細胞移植や臓器移植などの根本治療が有効であると考えられる。しかし、移植に用いる細胞・臓器の確保や、移植技術も十分ではない。

現在、ヒトの医学において幹細胞またはその分化細胞の移植が再生医療として、活発に研究開発されている。その中でも胚性幹細胞（Embryonic Stem Cell ; ES 細胞）や人工多能性幹細胞（Induced Pluripotent Stem Cell ; iPS 細胞）は無限に増殖し、個体の形成に必要なすべての細胞種に分化できることから注目を浴びている。特に iPS 細胞は、受精卵ではなく体細胞を初期化することで作製されるために、倫理的問題を伴わない。それゆえに、iPS 細胞を分化誘導して様々な細胞や臓器を作製し、再生医療に応用することが期待されている。また、iPS 細胞は作製に用いた体細胞と同様の遺伝子を有することから、遺伝性疾患の個体に由来する iPS 細胞は、

目的の細胞種に分化させることで、遺伝性疾患を細胞レベルで再現するツールともなり得る。これらの手法はヒトにおいては iPS 細胞バンクとして運用され、輸血治療に用いる血液系細胞の作製や初代細胞の入手が困難な神経疾患の研究に応用されている。

しかしながら、ネコにおいては iPS 細胞の作製技術は確立されておらず、その報告は見当たらない。iPS 細胞の作製に関して、ヒトやマウスでは白血球阻止因子 (LIF) を培地中に添加することで、iPS 細胞の分化能や増殖能が維持・増強されることが知られている。しかし、ネコ由来の LIF は作製されておらず、その作用も不明である。

以上を踏まえ、本研究ではネコ iPS 細胞を用いた再生医療を目指し、ネコ iPS 細胞株の樹立、神経幹細胞および赤芽球系細胞への分化誘導、およびその多能性維持に有用と思われるネコ LIF の作製とその活性の評価を試みた。

・第一章 レトロウイルスベクターによるネコ iPS 細胞株の樹立

第一節 ネコ iPS 細胞株の作製

ネコ胎子線維芽細胞 (ネコ EF) にレトロウイルスを用いて初期化に必要な 4 遺伝子 (マウス *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、および *c-Myc*) を導入し、ネコ iPS 細胞株の作製を試みた。

遺伝子導入したネコ EF をフィーダー細胞上に再播種した。その際、培地としてウシ胎子血清 (FBS) またはロックアウト血清代替物 (KSR) 添加ヒト胚性幹細胞培地を用い、それぞれの培地における iPS 細胞の初代コロニー形成に最適な細胞数を検討した。その結果、FBS 添加培地ではネコ EF の増殖が著しく、高濃度で再播種した際には初代コロニーの成長を阻害した。さらに、各培地における初代コロニー形成効率および継代数を比較したところ、初代コロニーは KSR 添加培地で多く形成された。一方、45 継代以上の長期継代は FBS 添加培地で可能であった。

以上の結果から、FBS 添加培地を用いることで長期継代可能なネコ iPS 細胞株を得ることができた。

第二節 ネコ iPS 細胞株の特性解析

本節では、得られたネコ iPS 細胞株の特性解析を行った。

ネコ iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様に、明瞭な核小体、高い核細胞質比と細胞間密度、明瞭な細胞間境界を有し、扁平なコロニーを形成して増殖した。また、長期継代や凍結融解を行った際にも、形態に変化は認められなかった。化学染色および免疫染色により未分化マーカーの発現を調べたところ、アルカリフォスファターゼ、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、NANOG、および OCT3/4 に陽性を示した。また、RT-PCR で遺伝子発現を調べたところ、導入遺伝子 (マウス *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、および *c-Myc*) の発現は継代を重ねることで抑制されていた。一方、内在多能性遺伝子 (ネコ *NANOG*、*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、および *c-MYC*) の発現は継代数が増加しても維持されていた。染色体異常を調べるために実施した核型解析では、 $2n = 38$,

XY と正常な核型を示した。多分化能を調べたところ、浮遊培養で胚様体を形成し、その後、接着培養した際には免疫染色で各胚葉のマーカー（外胚葉； β III-tublin、中胚葉；DESMIN、内胚葉；SOX17）に陽性を示す細胞が認められた。

以上の結果から、ネコ iPS 細胞株はヒト ES 細胞と類似した性質を示すことが明らかとなった。

・第二章 ネコ iPS 細胞株の多分化能の評価

本章では、ネコ iPS 細胞株を神経幹細胞および赤芽球系細胞へ分化誘導した。

胚様体の作製時に神経幹細胞誘導培地を用いることで、免疫染色で神経幹細胞マーカーである NESTIN に陽性を示す紡錘形細胞が得られた。次に、胚様体を血液分化培地で培養した後に細胞を解離し、メチルセルロース培地上に播種したところやや赤色を示す造血コロニーが得られた。このコロニーは大型のマクロファージ様細胞と、小型の赤芽球系細胞で構成されていた。

以上の結果から、ネコ iPS 細胞株は分化培地を用いることで神経幹細胞および血液系細胞に分化誘導できることが明らかとなった。

・第三章 多能性維持タンパク LIF の作製

第一節 ネコ LIF 遺伝子のクローニングおよびタンパク質の作製

ネコ EF から抽出した RNA を用いてネコ LIF 遺伝子をクローニングし、ネコ LIF タンパク質の作製を行った。

ネコ LIF 遺伝子の塩基数は 609bp であった。ヒトとネコの LIF 成熟タンパク質のアミノ酸配列は 90% が一致した。成熟タンパク質となる配列のみをタンパク質発現ベクター pCold-TF DNA に組み込み、大腸菌 BL21 を形質転換した。液体培養下で BL21 のタンパク質発現を誘導した後、超音波破碎を行ってタンパク質を回収した。Ni-NTA セファロースによる精製を行った後、SDS-PAGE で解析したところ、70 kDa 付近にバンドを確認できた。さらに、タグ配列を除去する Thrombin で処理したところ、約 20 kDa のタンパク質を得ることができた。これらのタンパク質の分子量はアミノ酸配列から予測される作製タンパク質およびネコ LIF タンパク質の分子量と一致した。

以上の結果から、ネコ LIF 遺伝子をクローニングしてその配列を明らかにし、大腸菌においてタンパク質の創製に成功した。

第二節 ネコ LIF タンパク質の生理活性の評価

本節では、得られたネコ LIF タンパク質の生理活性を、マウス ES 細胞、ヒト赤白血病細胞株 (TF-1 細胞)、およびネコ未成熟卵細胞を用いて評価した。

マウス、ヒト、またはネコ LIF をマウス ES 細胞培地に添加 (0 - 100 ng/ml) したところ、3 種の LIF は >0.2 ng/ml でマウス ES 細胞の総コロニー数を増加させ、 >1.0 ng/ml でアルカリフォスファターゼ陽性コロニーの割合を増加させた。LIF の ES 細

胞増殖・維持作用において動物種による差は認められなかった。次に、TF-1 細胞の培地に 3 種の LIF を添加 (0 - 5.0 ng/ml) し、細胞増殖率を評価した。その結果、ヒトまたはネコ LIF は TF-1 細胞の増殖を促進した。次に、臨床的に健康な雌ネコから摘出された卵巣を入手し、未成熟卵細胞を回収・培養した。その際、培地にネコ LIF を添加 (0 - 100 ng/ml) し、卵丘細胞層の厚さおよび卵細胞の核成熟率を評価した。その結果、ネコ LIF は >10 ng/ml で卵丘細胞の膨化を促進し、さらに 100 ng/ml でネコ未成熟卵の核成熟率を改善した。

以上の結果から、作製したネコ LIF は生理活性を有することを明らかにした。

・総括

1. FBS 添加培地を用いることで、長期継代可能なネコ iPS 細胞株の樹立に成功した。
2. 本細胞株は未分化マーカーを発現し、正常な核型と多分化能を有することから、ヒト ES 細胞と類似した性質を示すことを明らかにした。
3. 本細胞株は分化培地を用いて神経幹細胞および血液系細胞に分化誘導することができた。
4. ネコ LIF 遺伝子をクローニングしてその配列を明らかにし、大腸菌においてタンパク質の創製に成功した。
5. 作製したネコ LIF はマウス ES 細胞、TF-1 細胞、およびネコ未成熟卵細胞に作用したことから、LIF としての生理活性を有することを明らかにした。

審査結果の要旨

ネコは伴侶動物として広く飼育されており、小動物臨床における主要な診療対象である。近年、ネコにおいてもヒトと同様に糖尿病、慢性腎臓病など「生活の質」を大きく低下させる疾患や、さらに、品種・血統に関連する遺伝性疾患の研究・治療が課題となっている。これらを解決する方法として、人工多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cell ; iPS 細胞) を用いる方法が考えられている。iPS 細胞は、初期化因子を体細胞に導入することで作製される未分化な幹細胞であり、増殖効率が良く、様々な細胞に分化できる。そのため、ネコでも iPS 細胞を作製できれば、これを分化誘導して様々な細胞や臓器を作製し、再生医療に応用することが可能となる。また、遺伝性疾患を持つネコから iPS 細胞を作製することで、遺伝性疾患を細胞レベルで研究することが可能となる。しかしながら、ネコにおいては iPS 細胞の作製技術は確立されておらず、世界的にもその報告はない。また、白血病阻止因子 (LIF) は iPS 細胞の増殖に重要な役割を果たすと考えられるサイトカインであるが、ネコ由来の LIF は作製されておらず、その作用も不明である。

本研究では、ネコ iPS 細胞を用いた再生医療を目指し、第 1 章として、ネコ胎子線維芽細胞に初期化遺伝子を導入し、ネコ iPS 細胞株の樹立を試みた。第 2 章として、ネコ iPS 細胞株を用いて、基礎研究や臨床応用が期待される神経幹細胞および血液系細胞への分化誘導を試みた。第 3 章としてネコ iPS 細胞の培養維持に有用と考えられるネコ LIF 遺伝子のクローニングおよびシーケンス解析を行い、大腸菌におけるタンパク質発現の誘導および合成タンパク質の LIF としての活性の測定を行っている。

第 1 章では、初期化遺伝子と呼ばれる *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、および *c-Myc* 遺伝子を、レトロウイルスベクターによりネコ胎子線維芽細胞に遺伝子導入し、ネコ iPS 細胞株の樹立を試みている。その結果、FBS を添加した培地を用いることで長期継代可能なネコ iPS 細胞株を得ることに成功した。さらに、得られたネコ iPS 細胞はヒト胚性幹細胞(ES 細胞)と同様の形態的特徴を示し、各種の未分化マーカーの発現は陽性であった。また、核型解析の結果や導入遺伝子および内在性多能性維持遺伝子の発現状態もヒト iPS 細胞と類似した特性を示すことが明らかとなったことから、ネコ iPS 細胞株の樹立に成功したことが示されている。

第 2 章では、第 1 章で作製されたネコ iPS 細胞を用いて、神経幹細胞および血液系細胞への分化誘導を試みている。ネコ iPS 細胞株をアストロサイト培養上清で浮遊培養後、得られた浮遊細胞塊 (neurosphere) を神経幹細胞維持培地で接着培養することで、神経幹細胞マーカーである Nestin に陽性を示す紡錘形の細胞が得られている。また、ネコ iPS 細胞に種々のサイトカインを段階的に培地へ添加することでマクロファージ様細胞と赤芽球様細胞が確認されたことから、血液系細胞の分化誘導に成功している。

第 3 章では、ネコ iPS 細胞の維持培養に重要であると考えられる大腸菌を用いた組換えネコ LIF の作製を行っている。すなわち、ネコ LIF 遺伝子をクローニングしてシーケンス解析を行い、さらに大腸菌 BL21 を使用してタンパク質を創製後、単離した。このネコ LIF タンパク質は、マウス ES 細胞の増殖促進・未分化性維持、TF-1 細胞の増殖促進、ネコ卵丘細胞の膨化促進および未成熟卵細胞の核成熟率改善といった作用を示したことから、生理活性を持つネコ LIF であることが示されている。

本研究は、世界で初めてネコにおける iPS 細胞の作製に成功し、さらに、ネコ iPS 細胞から神経幹細胞および血液系細胞への分化誘導に成功した。また、ネコ iPS 細胞の培養維持に有用と考えられる生理活性を有するネコ LIF タンパク質を創製している。これらの研究成果は、臨床獣医学や再生医学の発展に大きく貢献するものであり、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。