

称号及び氏名	博士（獣医学）	西村 俊哉
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	イヌ iPS 細胞株および人工誘導胚体外内胚葉細胞株の樹立と分化誘導に関する研究	
論文審査委員	主査	稲葉 俊夫
	副査	玉田 尋通
	副査	山手 丈至

論文要旨

諸言

人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は胚性幹細胞(ES 細胞)と同様の多能性と自己複製能を保持し、ES 細胞が潜在的にもつ倫理的問題や免疫拒絶を解決すると期待されている。一方、胚体外内胚葉細胞(XEN 細胞)は胚盤胞期胚の原始内胚葉から分離される幹細胞であり、高い自己複製能と分化能を有する細胞であることから、近年、新たな細胞資源として注目されている。iPS 細胞が樹立されて以降、再生医療は注目を浴び、研究が進められてきたが、未だ臨床応用は難しく、その背景にはヒト再生医療の安全性や治療効果を検証するための適切な疾患モデル動物がないことが挙げられる。イヌはヒト再生医療の安全性や治療効果を評価する上で非常に重要な動物であり、イヌの再生医療で得られた知見は、ヒト再生医療においても有益であると考えられる。以上を踏まえ、本研究では、イヌにおける再生医療の応用的基盤技術の開発を目的とし、イヌ iPS 細胞株および人工誘導 XEN 細胞 (iXEN 細胞) 株の樹立およびその分化誘導を試みた。

第一章 レンチウイルスベクターを用いたイヌ iPS 細胞の作製と血小板への分化誘導

第一節 レンチウイルスベクターを用いたイヌ iPS 細胞の作製

レンチウイルスベクターを用いてイヌ iPS 細胞の作製とその特性解析を行った。イヌ胎子線維芽細胞 (CEF) にレンチウイルスベクターを用いてヒト多能性維持遺伝子 (*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、および *C-MYC*) を導入することで、イヌ iPS 細胞の作製を試みた。その結果、ドーム状の ES 様細胞コロニーが出現し、本細胞コロニーは未分化マーカーを発現し、28 継代まで維持できた。一方、外因性遺伝子の発現は抑制されていた。本細胞は、胚様体を形成し、その後に接着培養することで三胚葉への分化能を有することが確認された。

第二節 イヌ iPS 細胞から血小板への分化誘導

前節で得られたイヌ iPS 細胞を骨髄由来 OP9 ストロマ細胞と共培養することで血小板への分化誘導を行った。イヌ iPS 細胞を OP9 細胞と共培養することで、内部に大型球形細胞を有した囊状構造物が出現した。この囊状構造物を OP9 細胞上に再播種し、造血サイトカインと培養すると、培養上清中に造血幹細胞マーカーである CD34 抗体陽性を示す大型浮遊細胞および巨核球/血小板マーカーである CD41/61 抗体陽性を示す巨核球が確認された。さらに、末梢血血小板と同様のサイズをもつ粒子が確認され、本粒子は CD41/61 に陽性を示し、トロンビン存在下でフィブリノーゲン結合能を有し、電子顕微鏡下で末梢血血小板と同様の内部構造を示した。

第二章 薬剤誘導性レンチウイルスベクターを用いたイヌ iPS 細胞の作製と無血清・無フィーダー細胞条件下での培養維持

第一節 薬剤誘導性ベクターを用いたイヌ iPS 細胞の作製

薬剤誘導性ベクターを用いてイヌ iPS 細胞の作製と無血清・無フィーダー細胞条件下での培養維持を行った。CEF にドキシサイクリン (DOX) 誘導性レンチウイルスベクターを用いてマウス多能性維持遺伝子を導入することで、薬剤誘導性イヌ iPS 細胞の作製を試みた。その結果、無血清条件下で iPS 様細胞コロニーが出現し、本細胞コロニーは外因性および内因性の多能性維持遺伝子を発現し、DOX 存在下で 50 継代以上の長期継代が可能であった。また、得られた細胞は胚様体を形成し、三胚葉への分化能が確認された。

第二節 イヌ iPS 細胞株の無血清・無フィーダー細胞条件下における培養維持

前節で得られたイヌ iPS 細胞を無血清・無フィーダー細胞条件下で培養を行った。イヌ iPS 細胞は単一細胞継代培養を行うことができ、血清無添加の培地にマトリゲル上で培養したところ、フィーダー細胞上と同様に培養維持することが可能であった。また、本細胞はマトリゲル上においてもフィーダー細胞上と同様に、多能性維持遺伝子の発現を示した。無血清・マトリゲル上と血清添加・フィーダー細胞上での培養を比較したところ、イヌ iPS 細胞の多能性維持遺伝子の発現は無血清・マトリゲル上で上昇を示した。また、本細胞を transforming growth factor β 1 阻害剤

(TGFβi)、mitogen-activated protein kinase p38 阻害剤 (p38i)、および Janus kinase 阻害剤を用いて培養したところ、多能性維持遺伝子の上昇が観察された。

第三章 薬剤誘導性レンチウイルスベクターを用いたイヌ iXEN 細胞の作製と肝細胞への分化誘導

第一節 薬剤誘導性レンチウイルスベクターを用いたイヌ iXEN 細胞の作製

体細胞に多能性維持遺伝子を導入し、低分子化合物を添加した培地で培養することで、イヌ iXEN 細胞の作製とその特性解析を行った。第二章と同様のベクターを用いてマウス多能性維持遺伝子を CEF に導入し、白血球阻害因子(LIF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、TGFβi、および p38i を加えた培地にて培養したところ、大理石様の形態をもった細胞が出現し、扁平なコロニーを形成した。本細胞は AP 染色および種々の XEN 細胞マーカーに陽性を示した。一方、多能性維持遺伝子の発現を示さなかったことから、本細胞は XEN 様細胞であると考えられた。さらに、本細胞は外因性遺伝子の非発現下においても 50 継代以上の長期継代が可能であり、無フィーダー細胞条件下では、臓側および壁側内胚葉に分化した。

第二節 イヌ iXEN 細胞様株から肝細胞への分化誘導

前節で得られたイヌ iXEN 細胞様株を OP9 細胞と共培養することで、肝細胞への分化誘導を行った。イヌ iXEN 細胞様株を OP9 細胞と共培養したところ、多核構造を持つ細胞が出現し、AP 染色に陽性を示す細胞塊を形成した。本分化細胞はイヌアルブミンの発現を示した。さらに、本分化細胞は成熟肝細胞マーカーである CYP3A4 遺伝子を発現しており、肝細胞マーカーである FOXA2 遺伝子の発現も胎子肝臓と同レベルまで上昇を示した。また、本分化細胞は三次元管様構造を形成し、毛細胆管膜マーカーMRP2 タンパクの発現を示した。

第四章 センダイウイルスベクターを用いたイヌ iXEN 細胞の作製

第一節 センダイウイルスベクター(SeVdp)を用いたイヌ iXEN 細胞の作製

SeVdp を用いて遺伝子組換えの無いイヌ iXEN 細胞の作製とその特性解析を行った。CEF に SeVdp を用いてヒト多能性維持遺伝子を導入することで、ドーム状の細胞コロニーが出現した。本細胞コロニーを数回継代することで出現した細胞は、前章で得られたイヌ iXEN 細胞様株と同様の形態を示し、培養維持が可能であった。本細胞は AP 染色に陽性を示し、7 継代で SeVdp の発現が消失していたことから、外因性多能性維持遺伝子の発現抑制が確認された。また、本細胞コロニーは XEN 細胞マーカーの発現を示すが、一方、内因性多能性維持遺伝子の発現は示さなかった。

第二節 遺伝子組換えの無いイヌ iXEN 細胞の多能性の評価

前節で得られたイヌ iXEN 細胞の多能性の評価を行った。SeVdp を用いたイヌ iXEN 細胞を OP9 細胞と共培養することで、アルブミンを発現する肝細胞および MRP2 を発現する胆管上皮細胞に分化誘導した。また、本イヌ iXEN 細胞を TGFβi、p38i および LIF を添加した培地で培養し続けると、嚢状構造物が出現し、この構造物は β-III-TUBLIN 陽性の神経様細胞に分化誘導が可能であった。さらに、本イヌ iXEN 細胞を骨形成因子 4 および bFGF を添加した培地で培養することで、色素産生細胞様細胞へ分化誘導できた。

総括

1. レンチウイルスベクターを用いて体細胞からイヌ iPS 細胞を作製し、本細胞から機能的な血小板への分化誘導に成功した。
2. 薬剤誘導性レンチウイルスベクターを用いてイヌ iPS 細胞を作製し、無血清・無フィーダー細胞の培養条件下で本細胞の株化に成功した。
3. 薬剤誘導性レンチウイルスベクターを用いてイヌ iXEN 細胞様株の樹立に成功し、本細胞株から肝細胞へ分化誘導できることを明らかにした。
4. SeVdp を用いて遺伝子組換えの無いイヌ iXEN 細胞を作製し、本細胞が多能性を有していることを明らかにした。

審査結果の要旨

2006 年に山中教授らによって樹立された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、胚性幹細胞(ES 細胞)と同様の多能性と自己複製能を保持し、ES 細胞が免疫拒絶や潜在的にもつ倫理的問題を解決する細胞として再生医療に期待されている。一方、胚体外内胚葉細胞(XEN 細胞)は、ES 細胞と比べて分化の進んだ後期胚盤胞期胚の原始内胚葉から分離される幹細胞であり、内胚葉系への分化方向性をもつ細胞であることから、近年、新たな細胞資源として注目されている。iPS 細胞が樹立されて以降、再生医療は注目を浴び、研究が進められてきたが、未だ臨床応用は難しく、その背景にはヒト再生医療の安全性や治療効果を検証するための適切な疾患モデル動物がないことが挙げられる。イヌはヒト再生医療の安全性や治療効果を評価する上で重要な動物であり、イヌの再生医療で得られた知見は、ヒト再生医療においても有益であると考えられる。

本研究では、イヌにおける再生医療の応用的基盤技術の開発を目的とし、イヌ iPS 細胞株および人工誘導 XEN(iXEN)細胞株の樹立およびその分化誘導について検討している。

第 1 章では、イヌ体細胞に初期化因子を導入することで、iPS 細胞の作製を行う

とともに、得られたイヌ iPS 細胞を血小板へ分化誘導している。レンチウイルスベクターを遺伝子導入し、血清代替物、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、および白血病阻害因子(LIF)を培地に添加することで、体細胞からドーム型のイヌ iPS 細胞コロニーが得られた。また、本細胞を骨髄由来 OP9 ストローマ細胞と共培養することで、世界で初めてイヌ iPS 細胞から末梢血血小板と同等の内部構造を持ち、フィブリノーゲン結合能を有する機能的な血小板を分化誘導したことから、上記の培養条件において高い多分化能を有するイヌ iPS 細胞が得られる可能性が示唆され、また、イヌ iPS 細胞から血小板への分化誘導法を開発している。

第 2 章では、薬剤誘導性レンチウイルスベクターを用いたイヌ iPS 細胞株の樹立と無血清・無フィーダー細胞条件下でのイヌ iPS 細胞の培養維持を試みている。ドキシサイクリン(DOX)の有無により外因性遺伝子の発現を維持できるレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入することで、DOX 存在下で 50 継代以上培養維持が可能であるイヌ iPS 細胞コロニーが得られた。また、本細胞は、無血清・無フィーダー細胞条件下で培養維持が可能であったことから、外因性遺伝子を持続的に発現させることで、イヌ iPS 細胞が長期継代できることを明らかにし、さらに、無血清・無フィーダー細胞条件下での培養維持ができることを提示している

第 3 章では、薬剤誘導性ベクターを用いたイヌ iXEN 細胞株の樹立と肝細胞への分化誘導を試みている。第二章と同様のベクターを用いて遺伝子導入し、bFGF、LIF、および低分子阻害剤を添加した培地にて培養することで、XEN 細胞と類似した性質を有するイヌ iXEN 細胞様細胞を得た。本細胞は外因性遺伝子の非発現下においても 50 継代以上の長期継代が可能であり、本細胞株を OP9 細胞と共培養したところ、肝細胞様細胞および毛細胆管様細胞で構成された肝組織様構造が得られたことから、イヌ iXEN 細胞の維持培養液を開発するとともに、本細胞が胚体内内胚葉系細胞に分化誘導できることを明らかにしている。

第 4 章では、センダイウイルスベクター(SeVdp)を用いて遺伝子組換えの無いイヌ iXEN 細胞の作製と性状解析を行うとともに、本細胞の多能性の評価を試みている。SeVdp を用いて遺伝子導入し、第 3 章の培地条件から bFGF を除いた培地にて培養することで、XEN 細胞と類似した性質を有するイヌ iXEN 細胞様細胞を得た。本細胞は、SeVdp の発現消失が確認され、肝細胞様細胞、神経様細胞、および色素産生細胞様細胞に分化誘導可能であったことから、遺伝子組換えの無いイヌ iXEN 細胞様細胞を作製し、本細胞が多能性を有しうることを明らかにしている。

本研究は、イヌ iPS 細胞の作製および機能的な血小板への分化誘導法を開発し、外因性遺伝子を恒常的に発現させることで長期継代可能なイヌ iPS 細胞株が樹立できることを明らかにしている。また、世界で初めてイヌ iXEN 細胞様株を作製し、

本細胞株が肝細胞への分化能を有し、胚葉を超えた分化能を有する可能性を提示している。これらの研究成果は、獣医学・医学、特に幹細胞学の研究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。