

称号及び氏名	博士(獣医学)	木村 和人
学位授与の日付	2024年3月31日	
論文名	イヌ iPS 細胞の作製・培養基盤の構築と赤血球への分化誘導に関する研究	
論文審査委員	主査	鳩谷 晋吾
	副査	杉浦 喜久弥
	副査	桑村 充

## 論文要旨

### 緒言

獣医療では、血液バンクがなく、献血ドナー犬の確保が難しいため、血液不足が深刻な問題となっている。一方、自己複製能と多分化能を有するイヌ人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) から赤血球を大量作製できれば、血液の安定供給が可能となる。これを実現するには、イヌ iPS 細胞の作製、大量培養、および赤血球への分化誘導の手法を明らかにする必要がある。

これまでイヌ iPS 細胞作製には線維芽細胞が用いられてきたが、その採取はドナーへの侵襲性が高い。一方、血液細胞は採血により採取可能で、ドナーの負担が小さい。さらに、血液細胞由来 iPS 細胞は、線維芽細胞由来 iPS 細胞より造血細胞へ分化誘導しやすい可能性がある。しかし、当研究室で血液細胞由来イヌ iPS 細胞の作製を試みてきたが、初期化効率が低く、低品質なイヌ iPS 細胞の作製にとどまっている。

イヌ iPS 細胞は、血清含有培地とフィーダー細胞を用いる On-feeder 条件で培養され、継代は手作業で行う。しかし、血清やフィーダー細胞のロット間差により実験再現性が低く、また、培養に膨大な労力と時間がかかるため、大量培養が困難である。

また、ヒトやマウスでは iPS 細胞から赤血球への分化誘導法が複数報告されている一方で、イヌ iPS 細胞から赤血球への分化誘導法は明らかでない。

そこで本研究では、血液細胞から品質が高いイヌ iPS 細胞の効率的な作製法および培養法を検討するとともに、赤血球への分化誘導を試みた。

## 第1章 血液細胞由来イヌ iPS 細胞の作製

本章では、イヌ血液細胞の効率的な初期化を目指し、複数の初期化培地を検討するとともに、ヒトやマウスで初期化を促進すると報告のある低分子化合物の添加について検討した。さらに、ヒト iPS 細胞を安定して培養可能な StemFit AK02N 培地 (StemFit) を使用することで、高品質な血液細胞由来イヌ iPS 細胞の効率的な作製を試みた。

センダイウイルスベクター SeVdp(KOSM)302L により多能性関連遺伝子を導入したイヌ末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) をフィーダー細胞上に播種し、3 種の初期化培地 (N2B27 培地、KSR 培地、または StemFit Basic02) ±低分子化合物カクテルで培養後、StemFit へ培地を変更して初期化した。初代コロニー形成効率は、N2B27 培地+低分子化合物カクテルの条件で他群と比較して有意に高かった。得られたイヌ iPS 細胞株は扁平な形態を示し、ベクターの除去が確認された。さらに、多能性マーカー発現、*in vitro* での多分化能だけでなく、テラトマ形成能も有しており、正常核型を保持していた。

以上より、血液細胞の初期化時に N2B27 培地+低分子化合物カクテルで培養後、StemFit へ培地を切り替えることで、PBMC から高品質なイヌ iPS 細胞を効率的に作製できることがわかった。

## 第2章 イヌ iPS 細胞の Feeder-free 培養法の検討

### 第1節 On-feeder 培養から Feeder-free 培養への移行

ヒト iPS 細胞の培養は、血清不含培地とフィーダー細胞の代替となる細胞外基質タンパクを組み合わせた Feeder-free 培養法が主流となっている。この方法では、培地や基質のロット間差が小さいため、実験再現性が高い。さらに、酵素で細胞をシングルセルにして継代するため、培養にかかる労力や時間が削減され、大量培養が容易である。そこで本章では、イヌ iPS 細胞の Feeder-free 培養を試みた。

On-feeder 培養されたイヌ iPS 細胞を複数のヒト幹細胞用培地と基質を組み合わせた条件へ移行した。その結果、アルカリフォスファターゼ染色陽性コロニー数は StemFit と iMatrix-511 で、他の群と比較して有意に増加した。次に、第一章と同様にイヌ PBMC を初期化し、得られた初代コロニーを StemFit と iMatrix-511 で継代培養したところ、高品質なイヌ iPS 細胞株が樹立された。

以上より、StemFit と iMatrix-511 を組み合わせた条件で、イヌ iPS 細胞の Feeder-free 培養が可能となった。

### 第2節 Weekend-free 培養法の検討

StemFit と iMatrix-511 を使用した Feeder-free 培養は、培地交換が毎日必要で、国内のみの利用に限られる。一方、StemFlex、mTeSR Plus および ciKIC 培地と基質のビトロネクチン (VTN-N) や Geltrex を用いる Feeder-free 培養法は、週末の培地交換なし (Weekend-free) で iPS 細胞培養が可能であり、国際的にも利用可能である。そこで本節では、上記の培地や基質でイヌ iPS 細胞の Weekend-free 培養を検討した。

イヌ iPS 細胞を上記の培地と iMatrix-511 を組み合わせて、Weekend-free で培養した。その結果、StemFlex および mTeSR Plus でのみ 5 継代以上、多能性マーカー発現を維持したまま培養可能であった。次に、StemFlex または mTeSR Plus 培地と基質の VTN-N または Geltrex を用いて、イヌ iPS 細胞を Weekend-free 培養をしたところ、全ての条件でイヌ iPS 細胞は安定して増殖し、iPS 細胞の特性を維持していた。

以上より、StemFlex または mTeSR Plus 培地と基質の VTN-N または Geltrex を用いることで、イヌ iPS 細胞の Weekend-free 培養が可能となった。

### 第 3 章 イヌ iPS 細胞から赤血球への分化誘導

#### 第 1 節 イヌ iPS 細胞から赤血球への分化誘導法の検討

ヒト iPS 細胞から赤血球への分化誘導法を参照し、イヌ iPS 細胞を血液分化培地で培養した。その結果、day 6 から 18 にかけて球形細胞が増加した。また、day 12 で多染性赤芽球、day 24 で正染性赤芽球と少数の脱核赤血球が観察された。分化細胞の多能性マーカー発現は day 0 から 6 にかけて低下した。一方で、中胚葉・造血前駆細胞マーカー発現は day 3 から 6 にかけて増加し、赤血球前駆細胞マーカー発現は分化誘導過程で増加した。さらに、分化細胞ペレットは淡赤色から暗赤色を示し、胚型、胎子型、および成体型の全タイプのヘモグロビン遺伝子を発現していた。

次に、赤血球へと分化しやすいイヌ iPS 細胞株の選別を試みた。まず、ステルス型センダイウイルスベクターを用いて、PBMC の培養により得られる赤芽球を初期化すると、高品質なイヌ iPS 細胞株が樹立された。その後、これまで当研究室で樹立した PBMC、皮膚線維芽細胞 (dermal fibroblast: DF)、および赤芽球由来イヌ iPS 細胞株を用いて上記方法で赤血球へ分化誘導し、その効率を比較した。得られた細胞数は PBMC、赤芽球、DF 由来イヌ iPS 細胞株の順に増加した。多能性マーカー陽性細胞の割合は、全ての細胞株で day 0 から 6 にかけて低下した。一方、中胚葉、および造血前駆細胞マーカー陽性細胞の割合は、それぞれ day 3 および 6 において PBMC 由来イヌ iPS 細胞株で、他株より有意に高くなった。

以上より、イヌ iPS 細胞から赤血球前駆細胞および少数の脱核赤血球へ分化誘導することに成功した。さらに、PBMC 由来イヌ iPS 細胞は、DF 由来イヌ iPS 細胞株と比較して、赤血球への分化効率が高いことが示された。

#### 第 2 節 レポーターイヌ iPS 細胞株を用いた赤血球解析系の確立

GYPA は赤血球表面マーカーであるが、イヌでは使用可能な抗 GYPA 抗体がない。そのため、赤血球への分化誘導効率を簡便に解析できる手段がなく、効率的な分化誘導法の検討を阻んでいる。そこで、CRISPR-Cas9 システムにより、GYPA 遺伝子座に EGFP 遺伝子を挿入したレポーターイヌ iPS 細胞 (GYPA-EGFP イヌ iPS 細胞) を作製し、抗体なしにイヌ iPS 細胞由来赤血球の検出および定量化を試みた。その結果、複数の GYPA-EGFP イヌ iPS 細胞クローンが得られ、そのうち解析した 3 クローンがイヌ iPS 細胞特性を維持していた。さらに、これらのクローンから第 3 章 第 1 節の手

法で分化誘導した細胞は EGFP を発現し、その陽性細胞の割合は day 6 から 18 にかけて 95%以上まで上昇した。

以上のことから、CRISPR-Cas9 システムにより GYPA-EGFP イヌ iPS 細胞の作製に成功した。さらに、この細胞株から分化誘導した細胞が GYPA/EGFP を発現したことから、イヌ iPS 細胞由来赤血球系譜細胞を抗体なしで簡便に解析可能となった。

## 総括

1. 血液細胞の初期化時に N2B27 培地+低分子化合物カクテルで培養後、StemFit へ培地を切り替えることで、PBMC から高品質なイヌ iPS 細胞を効率的に作製できる。
2. StemFit と iMatrix-511 を組み合わせることで、イヌ iPS 細胞の Feeder-free 培養が可能である。
3. StemFlex または mTeSR Plus 培地と基質の VTN-N または Geltrex を組み合わせることで、イヌ iPS 細胞 Weekend-free 培養が可能である。
4. イヌ iPS 細胞から赤芽球および少数の脱核赤血球へと分化誘導できる。
5. PBMC 由来イヌ iPS 細胞株は DF 由来イヌ iPS 細胞株と比較して赤血球への分化効率が高い可能性がある。
6. CRISPR-Cas9 システムにより GYPA-EGFP イヌ iPS 細胞が作製可能であり、これを用いることでイヌ iPS 細胞由来赤血球を抗体なしで簡便に解析できる。

## 審査結果の要旨

近年、獣医療では輸血に使用する血液不足が深刻な問題となっており、その解決策が求められている。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、自己複製能と多分化能を有することから、イヌ iPS 細胞から赤血球を大量に作製できれば、血液の安定供給が可能となり輸血問題を解決できると考えられる。これまで、イヌ iPS 細胞は線維芽細胞を初期化して作製されていた。しかし、血液細胞は採血により簡便に採取可能であり、線維芽細胞を採取するよりもドナーの負担が少ない。さらに、血液細胞由来 iPS 細胞は、線維芽細胞由来 iPS 細胞より血液細胞へ分化誘導しやすい可能性がある。また、イヌ iPS 細胞は、血清含有培地とマウス胎子線維芽細胞をフィーダー細胞として用いる On-feeder 条件で培養され、手作業で継代を行ってきた。しかし、これらの培養法では、血清やフィーダー細胞のロット間差により実験再現性が低く、培養に労力と時間がかかることから大量培養が困難であるという問題があった。さらに、ヒトやマウス iPS 細胞では、赤血球への分化誘導法がすでに報告されているが、イヌ iPS 細胞における赤血球への分化誘導法は十分に解明されていない。そこで本研究では、血液細胞から品質が高いイヌ iPS 細胞の効率的な作製法と大量培養法を検討するとともに、赤血球への分化誘導を試みている。

第1章では、イヌ iPS 細胞を作製するためにイヌ血液細胞の効率的な初期化方法を検討している。イヌ末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) にセンドライウイルスベクターSeVdp(KOSM)302L を使用して多能性関連遺伝子を導入後、フィーダー細胞上に播種した。この時の初期化培地として N2B27 培地を使用し、低分子化合物カクテルを添加することで高い初代コロニー形成効率を示した。さらに、これらの初代コロニーを継代して作製されたイヌ iPS 細胞株は、多能性幹細胞の特徴的な形態を示し、多能性マーカーの発現や内胚葉、中胚葉、外胚葉に分化する多分化能を有しており、正常核型を保持していた。以上より、血液細胞である PBMC から高品質なイヌ iPS 細胞を効率的に作製できることを見出している。

第2章では、イヌ iPS 細胞の Feeder-free 培養法を検討している。On-feeder 培養されたイヌ iPS 細胞を複数のヒト幹細胞用培地と細胞外基質を組み合わせた Feeder-free 培養条件へ移行した結果、StemFit 培地と細胞外基質である iMatrix-511 の組み合わせが最適であることを示した。さらに、第1章と同様にイヌ PBMC を初期化し、得られた初代コロニーを StemFit と iMatrix-511 で継代培養したところ、高品質なイヌ iPS 細胞株の樹立に成功している。次に、週末の培地交換なし (Weekend-free) で iPS 細胞培養が可能な市販のヒト幹細胞用培地と細胞外基質を使用してイヌ iPS 細胞を培養した。その結果、StemFlex または mTeSR Plus 培地と基質の VTN-N または Geltrex を用いることで、イヌ iPS 細胞の Weekend-free 培養が可能となることを明らかにしている。

第3章では、イヌ iPS 細胞から赤血球への分化誘導を試みている。すなわち、イヌ iPS 細胞を血液分化培地で培養した結果、正染色赤芽球と少数の脱核赤血球を得ることに成功している。次に、赤血球へと分化しやすいイヌ iPS 細胞株の選別を試みたところ、PBMC 由来イヌ iPS 細胞株は、皮膚線維芽細胞由来イヌ iPS 細胞株と比較して、赤血球への分化効率が高いことが示されている。さらに、CRISPR-Cas9 システムにより、GYPA 遺伝子座に EGFP 遺伝子を挿入したレポーターイヌ iPS 細胞 (GYPA-EGFP イヌ iPS 細胞) の樹立に成功し、抗体なしにイヌ iPS 細胞由来赤血球の検出や定量が可能となることを明らかにしている。

以上のように本研究では、血液細胞からのイヌ iPS 細胞の作製および大量培養法を明らかにし、さらにイヌ iPS 細胞から赤血球への分化誘導に成功している。これらの研究成果は、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。