

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Derivation of induced pluripotent stem (iPS) like cells from microminipig somatic cells by Sendai Viral transduction of 4 HumanG, OCT4, SOX2, KLF4, and c MYC
別タイトル	マイクロミニピッグの体細胞にヒトOCT4, SOX2, KLF4, c MYC をセンダイウイルスによって導入し誘導した人工多能性幹細胞に類似した細胞について
作成者 (著者)	山辺, 史人
公開者	東邦大学
発行日	2020.05.21
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 17.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：鈴木啓悦 / タイトル：Derivation of induced pluripotent stem (iPS) like cells from microminipig somatic cells by Sendai Viral transduction of 4 HumanG, OCT4, SOX2, KLF4, and c MYC / 著者：Fumito Yamabe, Koichi Nagao, Koichi Nakajima, Hideyuki Kobayashi / 掲載誌：Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry / 巻号・発行年等：5(1):101, 2017
著者版フラグ	none
報告番号	32661乙第2927号
学位記番号	乙第2769号
学位授与年月日	2020.05.21
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD55680186

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

山辺史人より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2769 号

学位申請者 : 山 辺 史 人

学位論文 : Derivation of induced pluripotent stem (iPS)-like cells from microminipig somatic cells by Sendai Viral transduction of 4 HumanG, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, and *c-MYC*

(マイクロミニピッグの体細胞にヒト *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* をセンダイウイルスによって導入し誘導した人工多能性幹細胞に類似した細胞について)

著 者 : Fumito Yamabe, Koichi Nagao, Koichi Nakajima, Hideyuki Kobayashi

公表誌 : Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry, 5(1): 101
DOI:10.15744/2348-9790.5.101

論文内容の要旨 :

ミニブタの幹細胞研究はここ最近、急速に進んでいる。その理由として、マウスやヒトにおける幹細胞研究は、ほかの種に比べて優位に進んでおり、これらの研究結果が、さらなるミニブタにおける幹細胞研究にフィードバックされているからだと考える。さらに、ヒトにおける疾患や病気のメカニズムの解明に、幹細胞研究は大きな役割を果たしている。多能性を持つ胚性幹細胞 (ES 細胞) を主体にした研究では、ブタの ES 細胞では、ヒトやマウスの ES 細胞と比較して、いくつかの課題が見い出された。にもかかわらず、ミニブタの ES 細胞は、in vitro や in vivo での分化の研究や、遺伝子標的、遺伝子組み換えのブタの産出に大きく貢献している。また、体細胞に数種類の転写因子を導入し、ES 細胞と同等の性質を持つ細胞を誘導することができ人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が存在する。ES 細胞の作成には、受精卵を用いる必要があるが、iPS 細胞の作成は実験室で容易に作成することができ、幹細胞研究が容易となった。

マイクロミニピッグは、富士マイクラ (株) によって開発された最も小さいミニブタである。これまでのミニブタでは、体系や体重も大型動物に分類され、手術を対象にした研究では優れているが、投薬や移植の研究のためには、飼育施設の確保や、取扱いに難渋するケースが多くある。また、ブタの研究を行なうことは、げっ歯類のマウスとは違い、ヒトにより近い条件で研究

ができるところがメリットである。その点でも、マイクロミニピッグは、6 か月で体重 7 k g と、取扱いが容易である。筆者らは、マイクロミニピッグの体細胞から、センダイウイルスを用いてヒトの多能性に関与する転写因子を導入することにより、iPS 細胞が誘導できるかどうか検討を行なった。まず、マイクロミニピッグの皮膚から、線維芽細胞を樹立した。その後、マイクロミニピッグ由来線維芽細胞に対して、センダイウイルスを用いて、ヒト OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC を導入した。数週間後、形態的に ES 様細胞の誘導が見られた。これらの細胞を単離し、ヒト ES 細胞および iPS 細胞と同様の条件にて培養を行なった。これらの細胞を分析し、免疫染色では、多能性因子であるアルカリンフォスファターゼ、NANOG、SSEA4 の発現が見られた。また、in vitro における分化を調べるために、胚様体の形成を試みて誘導することができた。さらに、胚様体から三胚葉の分化を試みた。三胚葉のマーカーである α -smooth muscle actin、 α -fetoprotein、 β -III-tubulin の染色を行ない、それぞれ誘導を確認した。最後に、in vivo での多能性を確認するために、免疫不全マウスである SCID マウスの精巣内に移植した。3 か月を経過しても三胚葉を含む奇形腫の形成は観察できなかった。結論として、多能性を持った完全なマイクロミニピッグ由来 iPS 細胞は誘導することができなかった。この原因として、iPS 細胞の誘導に用いた転写因子がヒトではなく、ブタ由来のものであれば、成功した可能性が高いと思われた。また培養液についても、ヒト ES 細胞や iPS 細胞で用いているものをそのまま使用したが、完全には多能性を持たない細胞の誘導につながったと考えられる。

今後の課題として、質の高いマイクロミニピッグの iPS 細胞の誘導のためには、ブタに特徴的なシグナル伝達の解明や、培養液への栄養添加因子の同定が重要であると考えた。しかし、今回の筆者らの研究にて不完全ではあるが、マイクロミニピッグ由来 iPS 細胞を誘導ことができ、将来的に完全なマイクロミニピッグ由来 iPS 細胞が誘導できたときに、両者を比較することにより、iPS 細胞の誘導のメカニズムの解明の鍵を握っている可能性を秘めていると考えられる。今回、筆者らが誘導した不完全なマイクロミニピッグ由来 iPS 細胞は、今後の研究につながる一歩だと自負している。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2769 号	氏 名	山 辺 史 人
学位審査担当者	主 査	鈴 木 啓 悦
	副 査	関 戸 哲 利
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	内 藤 篤 彦
	副 査	杉 山 篤

学位論文の審査結果の要旨 :

ヒトにおける疾患メカニズムの解明に、ブタは実験モデルとして扱いやすく、また生物学的特徴が齧歯類などと比較してヒトに近いことから、研究対象として有用と考えられている。マウスやヒトにおける幹細胞研究の結果が、ブタにおける幹細胞研究にフィードバックされてきている。多能性を持つ胚性幹細胞 (ES 細胞) と同等の性質を有する細胞を誘導可能な人工多能性幹細胞(iPS 細胞)が存在するが、ES 細胞の作成に受精卵を用いる必要があるのに対して、iPS 細胞の作成は実験室で容易に作成することができる点で優れる。申請者は、富士マイクラ (株) によって開発された最も小さいミニブタであるマイクロミニピッグを用いて実験を行った。マイクロミニピッグの体細胞から、センダイウイルスを用いてヒトの多能性に関与する 4 つの転写因子を導入することにより、iPS 細胞が誘導できるかどうか検討を行なった。結論としては、未分化マーカーおよび 3 胚葉分化は示されたものの、奇形腫の形成が得られず、完全なマイクロミニピッグ由来 iPS 細胞は誘導することができなかつたが、①初期化因子の検討、②低分子阻害薬の利用、③転写活性の高いプロモーター選択、④遺伝子導入システムの検討の重要性が示唆された。ブタの iPS 細胞の誘導は他種の細胞と比較して難易度が高いとされる。今回の研究にて不完全ではあるが、マイクロミニピッグ由来 iPS 細胞を誘導することでき、将来的にブタ iPS 細胞の誘導メカニズムの解明につながる可能性を秘めていると考えられ、本研究の有用性が示された。

学位審査会において、「iPS を樹立するためにオスを使った理由は何か?」「他のマイクロミニピッグを用いた場合はどうであったか?」「既にブタ iPS 細胞は報告されているが、今回樹立に至らなかった原因は何か?」「vivo で奇形腫ができれば iPS と言えるのか?あるいは奇形腫ができなければ iPS と言えないのか?」「マイクロミニピッグ由来 iPS 細胞の樹立による再生医療分野へのインパクトは?」「iPS 細胞による再生医療の泌尿器科分野への応用の可能性、現在と今後の位置づけは?」「iPS 様細胞の SCID マウス精巢への投与後の肉眼的・顕微鏡的所見はどうか?」「他の条件下での実験や検討はされたのか?」「SSEA1 が陰性の意義は?」「継代培養中でのセンダイウイルスの状況の確認は?」などの技術的なものを含めた多くの質問に対して、申請者は真摯にかつ的確に回答した。以上より、本研究は、iPS 細胞の誘導メカニズムの解明につながる重要な知見を与える優れた研究であり、学位の授与に値すると判定した。