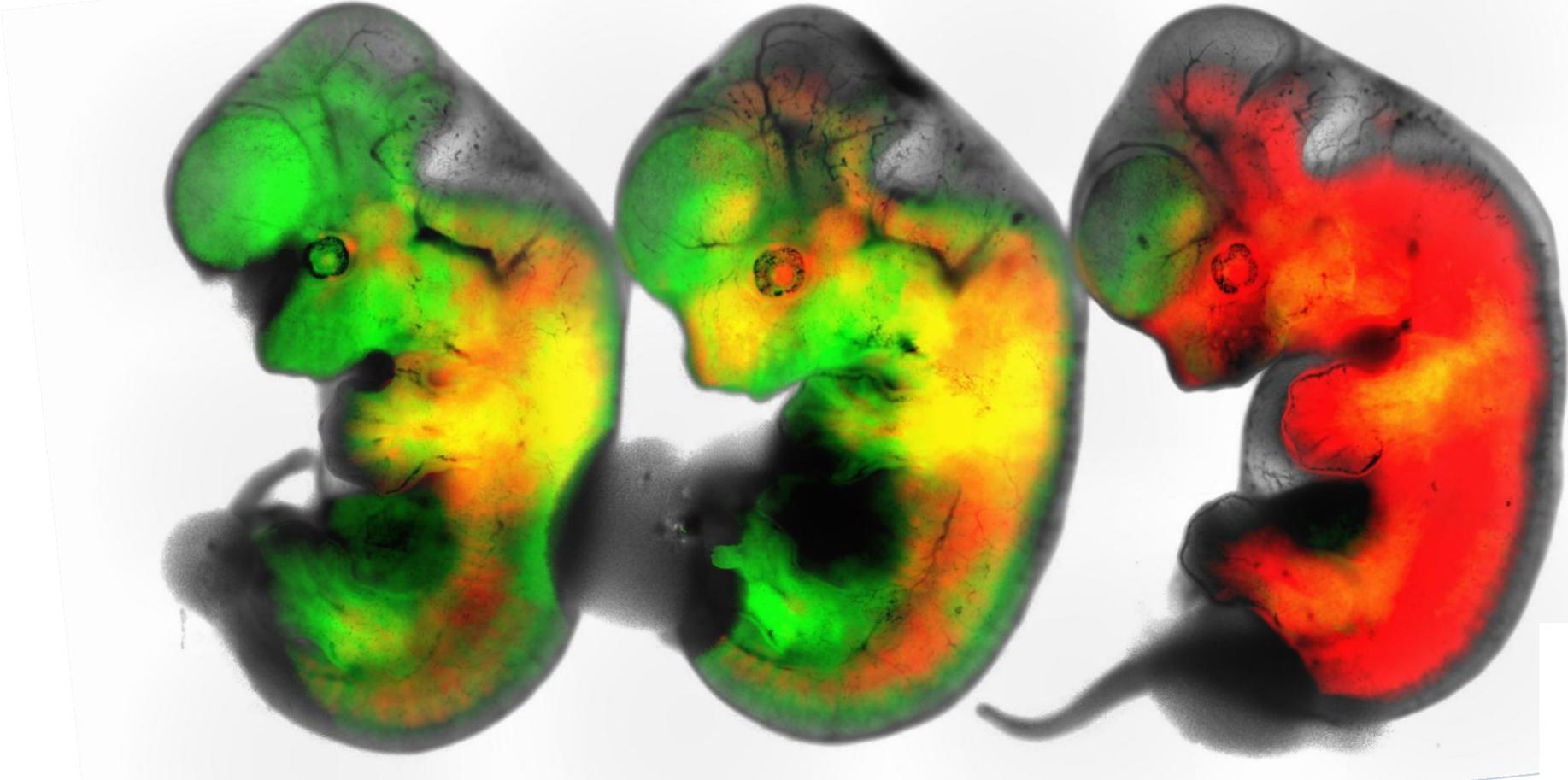


Stem cell technology and its application for organogenesis



Toshiya Nishimura, 西村俊哉 DVM、PhD

WPI-PRIME, Osaka University

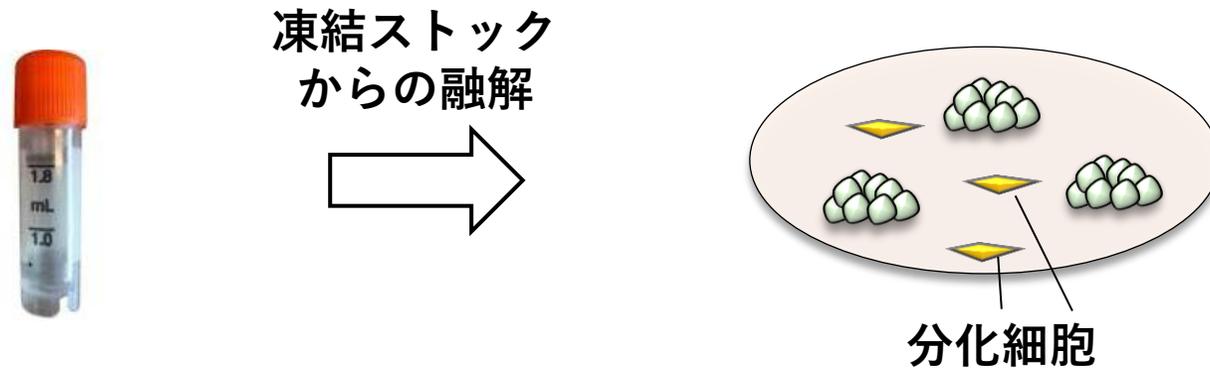


PRIME
WPI Osaka University

心筋細胞分化を高効率化！
イヌiPS細胞の培養最適化技術
大阪大学 ヒューマンメタバース疾患拠点 特任講師 西村 俊哉

ヒトと類似した循環器疾患や腫瘍、糖尿病を自然発症するイヌは、疾患モデル動物として非常に有用です。しかし、これまでイヌiPS細胞の安定かつ高効率な作製は困難とされてきました。本研究では、**アクチビンおよびWntシグナル阻害剤を含む培地（AR培地）**を用いることで、イヌiPS細胞の安定培養に成功しました。得られたiPS細胞は、心筋細胞への高効率な分化誘導が可能であり、実際に拍動する心筋組織の形成も確認されています。この技術は、イヌを用いた心疾患モデルの構築や、再生医療分野への応用が期待されるほか、臨床獣医療（犬の治療）への展開も視野に入れた新たなプラットフォームとなる可能性があります。

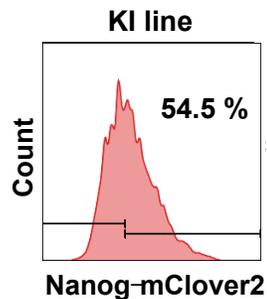
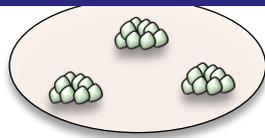
問題点：イヌiPS細胞は培養法が安定していない



イヌiPS細胞は簡単に分化し、多能性を失う

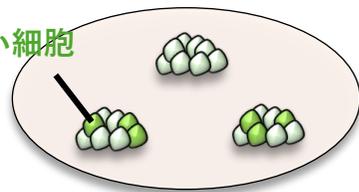
概要図

多能性遺伝子 (Nanog)
蛍光レポーター細胞株
(緑)



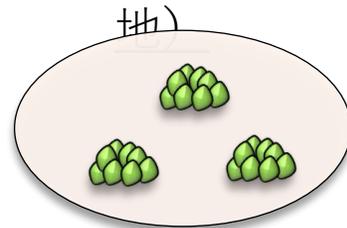
従来の培養法

多能性が高い細胞

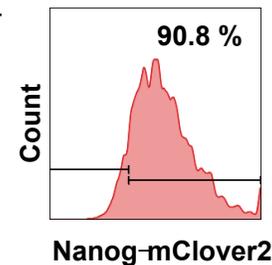


多能性遺伝子の発現
が高い細胞と低い細胞が混在

今回発明した培養法 (A+R培地)



90%以上が多能性遺伝子の
発現が高い細胞



心筋細胞への
分化誘導

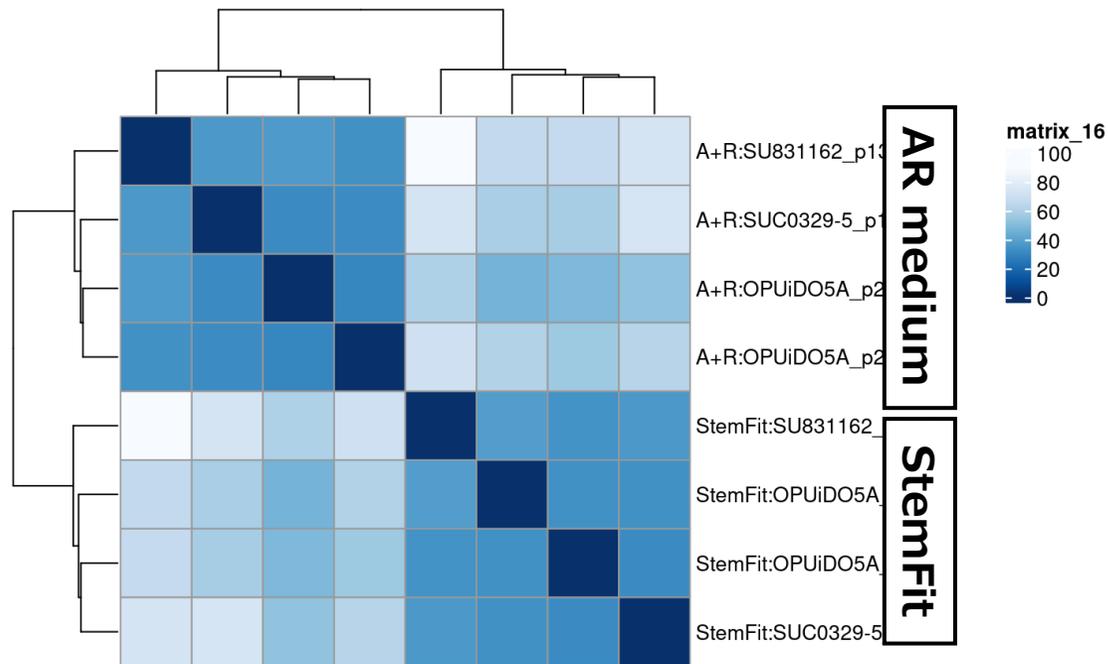
A+R培地のみで拍動する心筋細胞が出現

A+R培地の特徴

- ・凍結・解凍時にも安定
- ・分化遺伝子の発現消失
- ・培養が難しい細胞株も容易に培養
- ・心筋細胞への効率的な分化誘導
- ・分化誘導時に均一した細胞集団

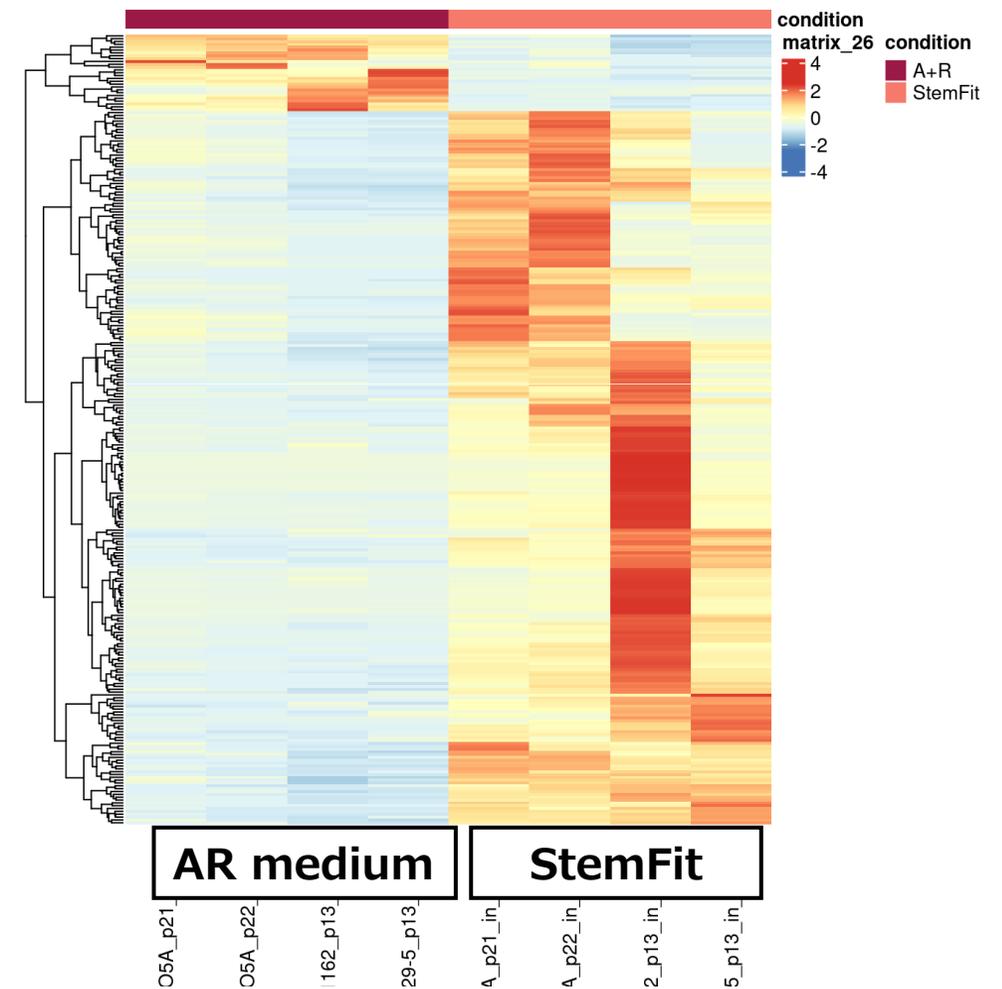
iPS細胞の遺伝子発現を“揃える”：AR培地

AR培地と既存の培地で培養されたイヌiPS細胞は異なる遺伝子発現を示す



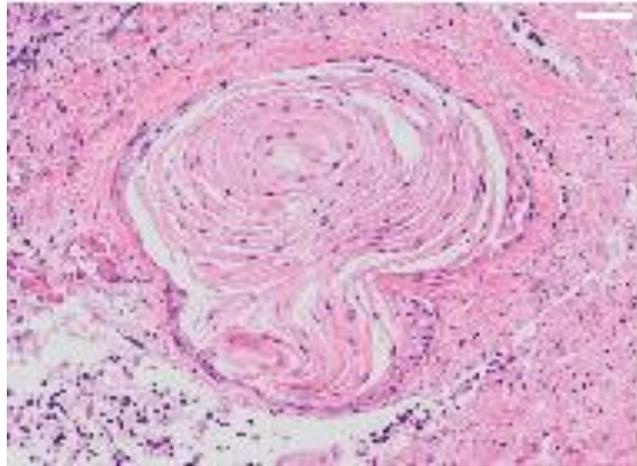
AR培地はイヌiPS細胞の遺伝子発現パターンを変化させ、遺伝子発現を均一化させる。

培地の違いによる遺伝子プロファイル

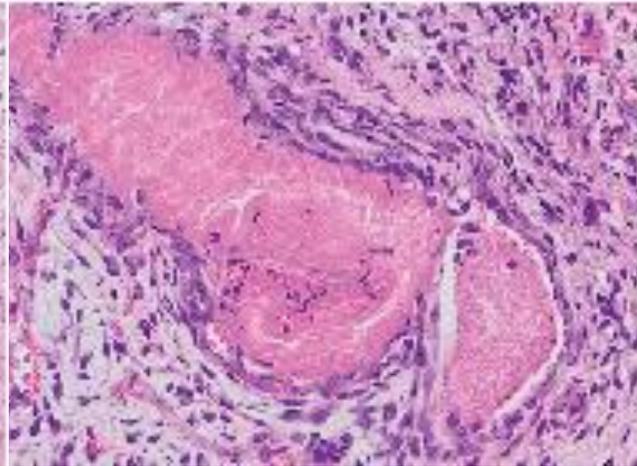


In vivoでの分化能

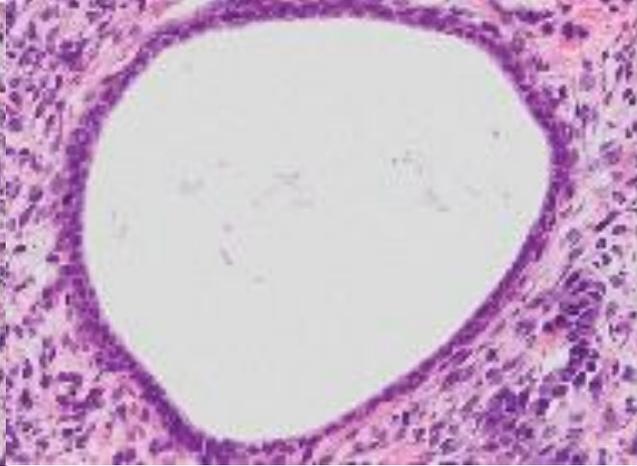
Ectoderm



Mesoderm



Endoderm



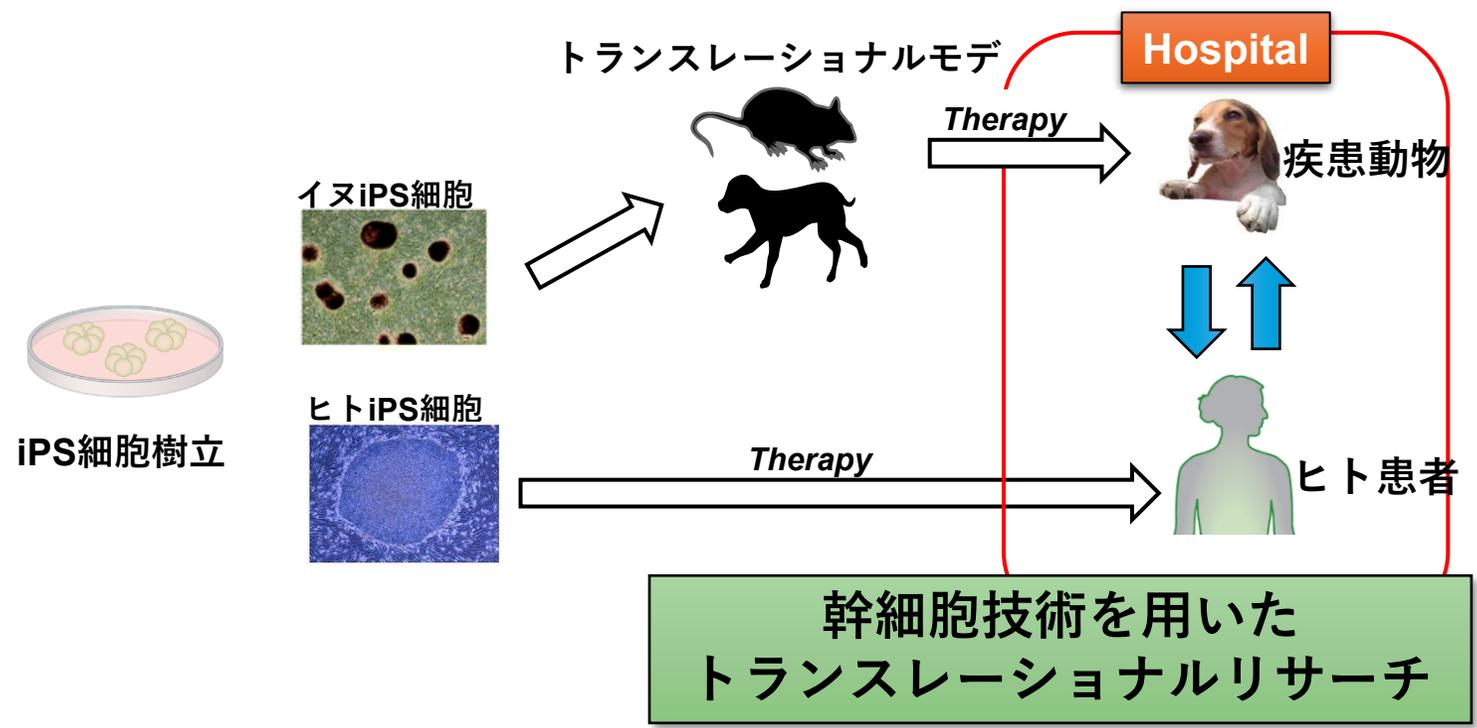
さらに、これまでin vivoでの分化能が確認できなかった細胞株においてもAR培地で培養することでin vivoでの分化が可能となった



イヌはヒト幹細胞治療における有用なトランスレーショナルモデル



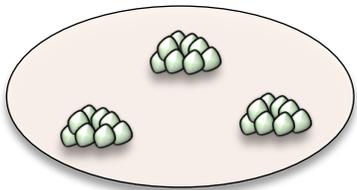
- ・ 生活環境を共有し、ヒトと共通の疾患を多く持つ
- ・ げっ歯類などの実験動物に比べ長い寿命を持つ
- ・ 実験動物であると同時に愛玩動物でもあることから実験的データ臨床的データのどちらも得ることができる



イヌはヒト幹細胞治療における有用なトランスレーショナルモデル



- ・ 生活環境を共有し、ヒトと共通の疾患を多く持つ
- ・ げっ歯類などの実験動物に比べ長い寿命を持つ
- ・ 実験動物であると同時に愛玩動物でもあることから実験的データ臨床的データのどちらも得ることができる

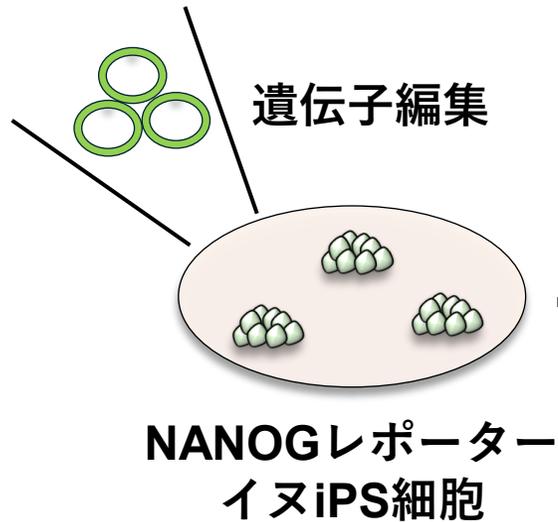


イヌiPS細胞

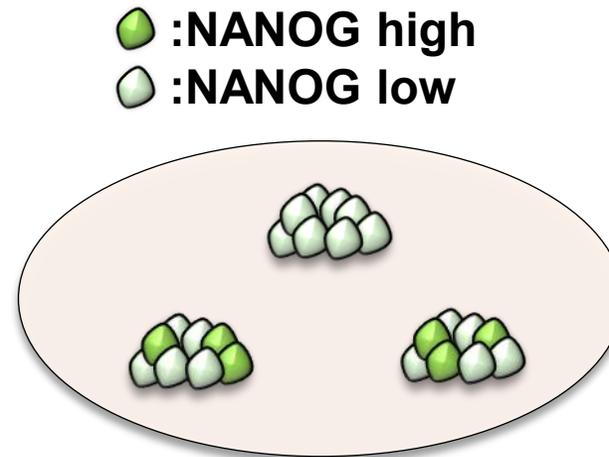
イヌiPS細胞を用いたヒト幹細胞治療モデルは
まだ存在していない

イヌiPS細胞の最適培地条件の検討

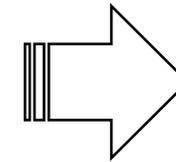
1. 蛍光タンパク質発現遺伝子を多能性遺伝子 (NANOG) に導入



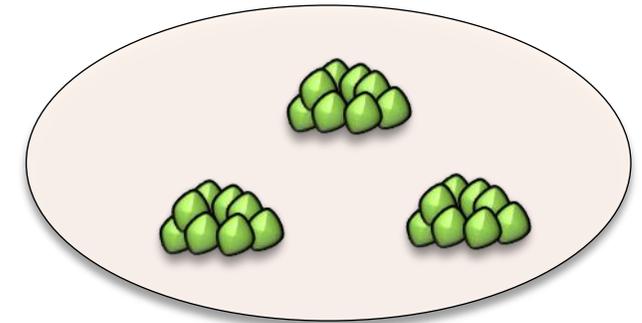
2. 蛍光発現を基に多能性が高いイヌiPS細胞の培地条件を検討



培地条件
の検討

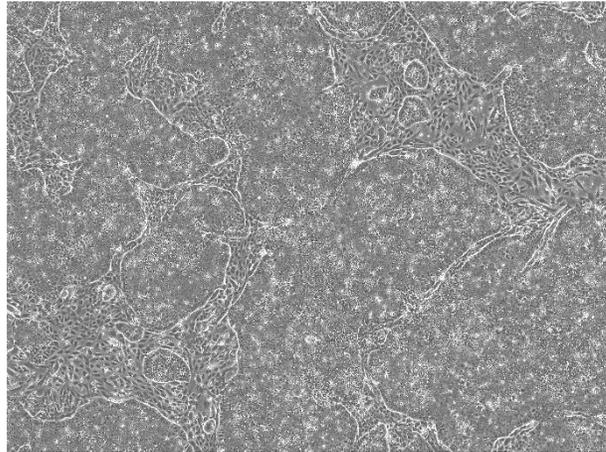


3. 新たな培地条件で培養したイヌiPS細胞が正常機能を有しているかの検討

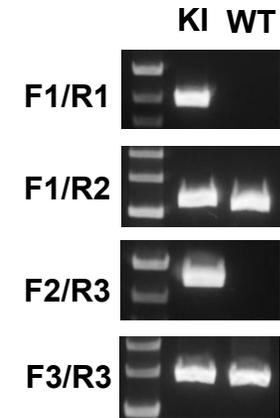
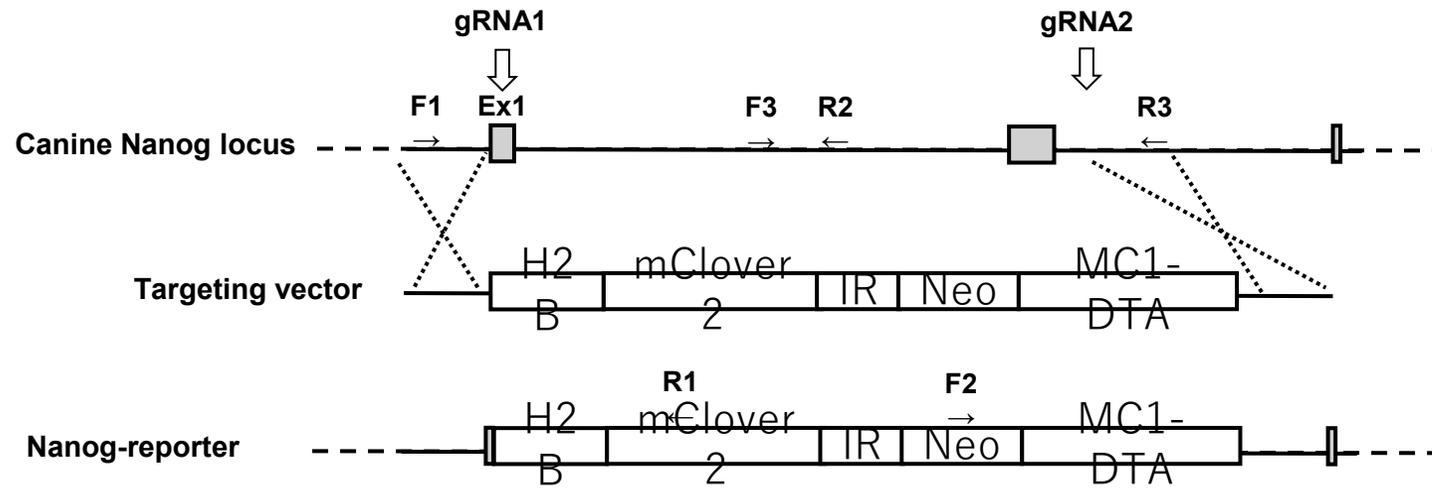
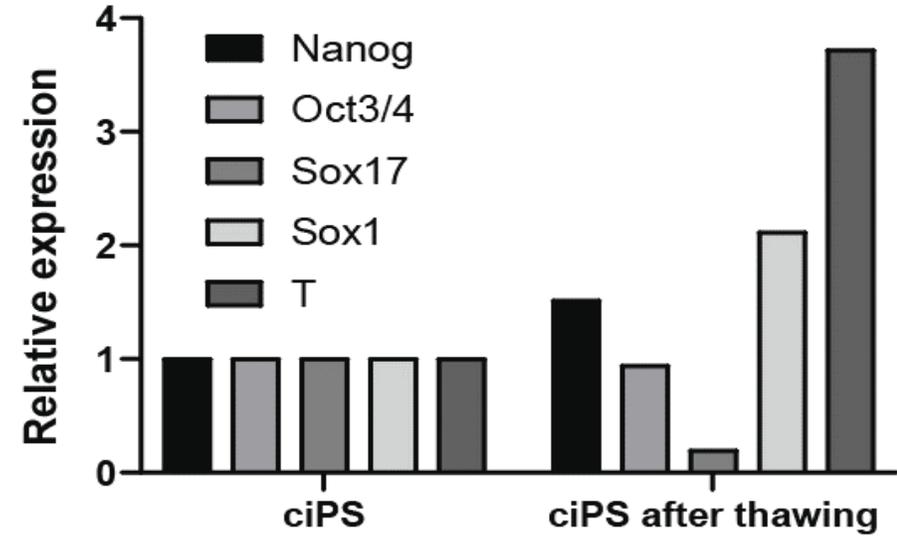
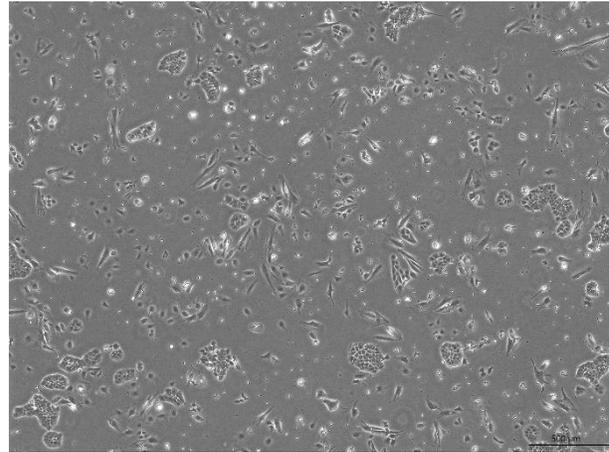


Nanog遺伝子レポーター細胞株の作製

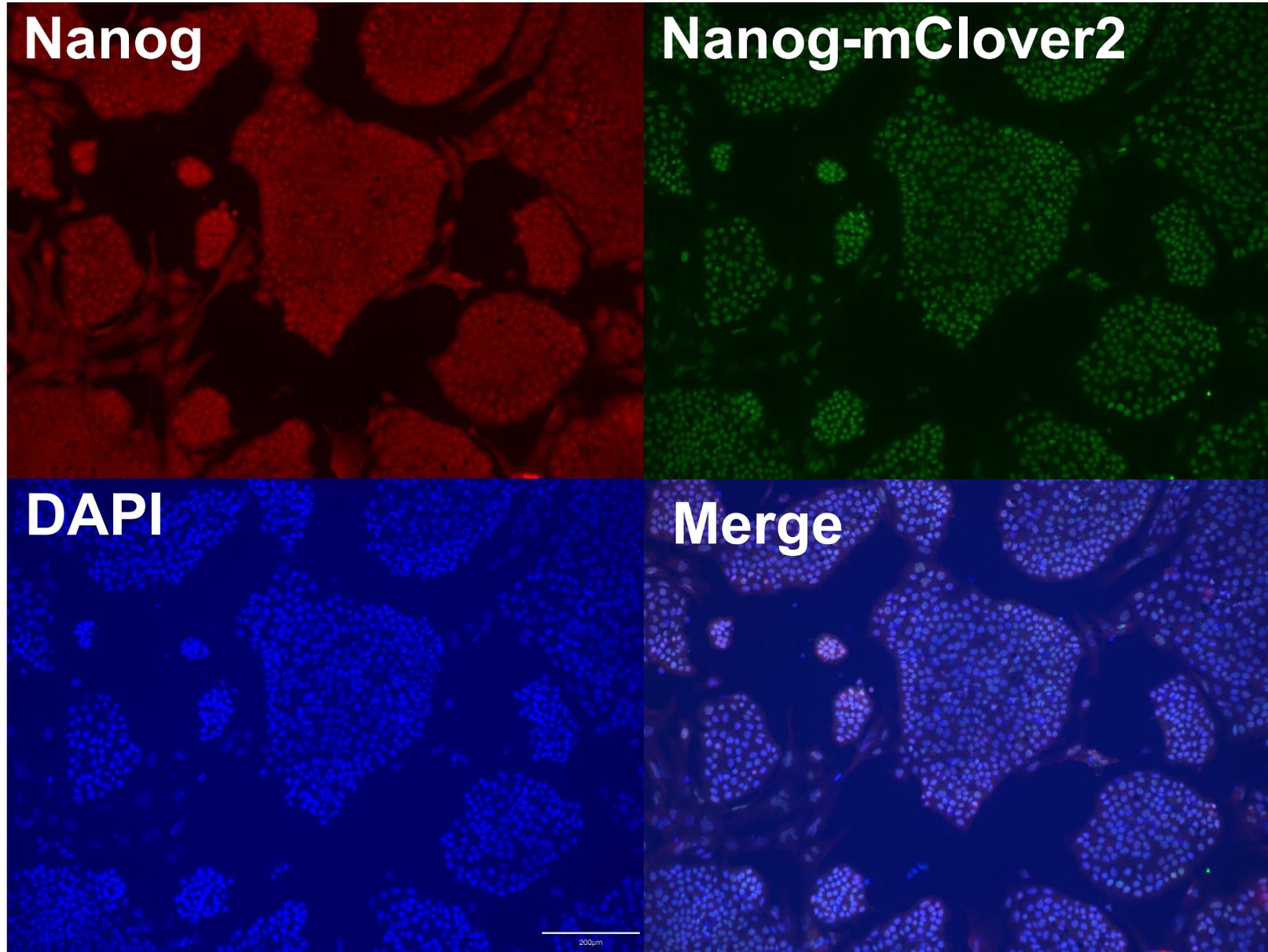
ciPSC



After thawing



Nanog遺伝子レポーター細胞株の作製

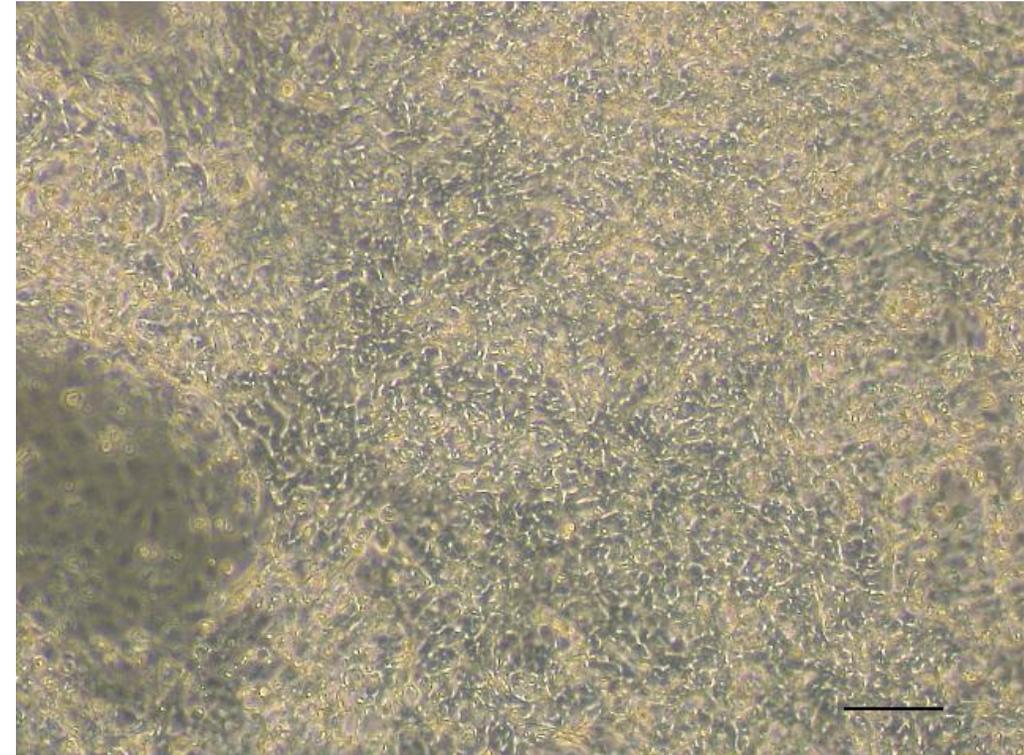


心筋分化(A+R培地) 9日目

X10 (動画)



X40 (動画)



A+R培地で培養したイヌiPS細胞から均質な拍動を刻む心筋細胞が誘導できた。一方、既存の培地のみでは拍動細胞はできなかった

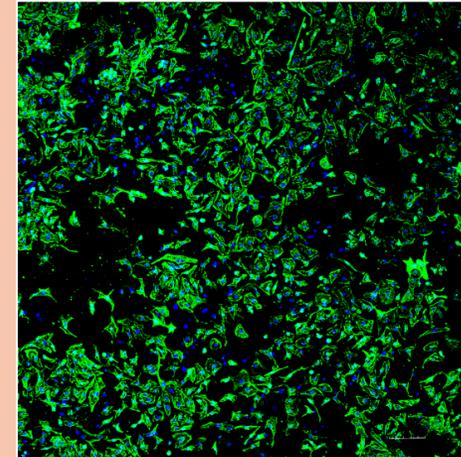
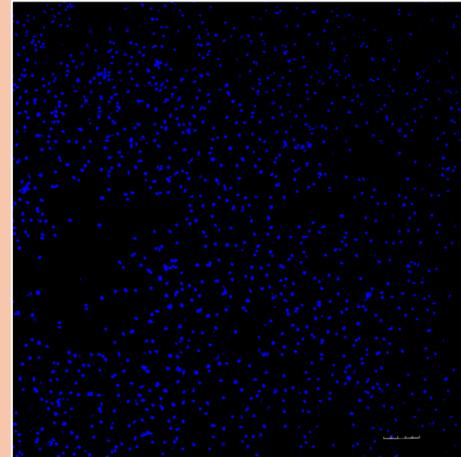
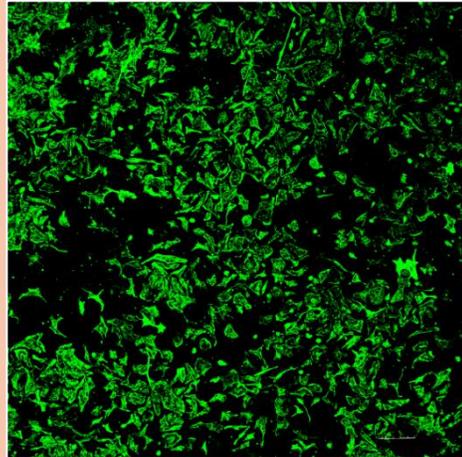
心筋分化(A+R培地) 9日目

cTnT (心筋マーカー)

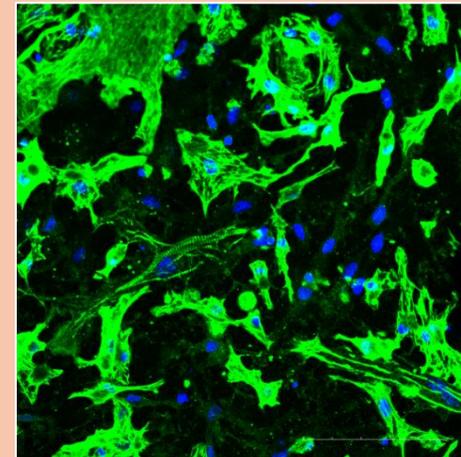
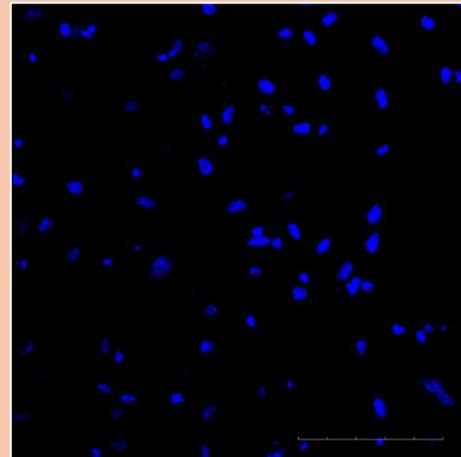
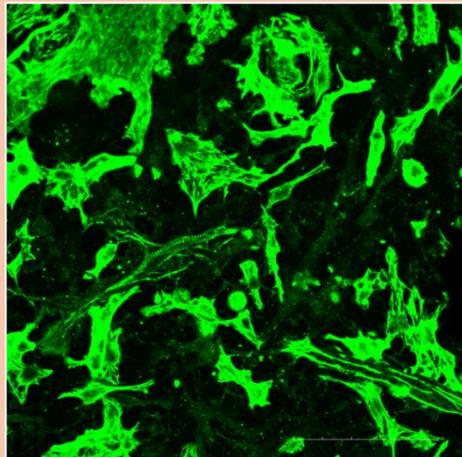
DAPI

Merge

X 10



X 40



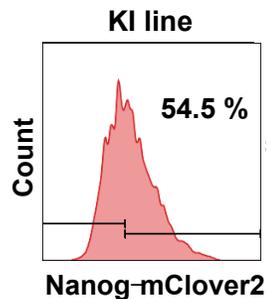
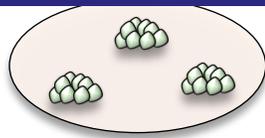
A+R培地で培養したイヌiPS細胞からできた心筋細胞はほとんどが心筋マーカーであるcTnTを発現していた

本技術の要点

- **Activn+Wnt**阻害剤培地 (**AR**) で培養することで既存の培地に比べイヌ**iPS**細胞が安定して培養可能となった。
- **A+R**で培養することで、凍結融解後に出現する分化細胞が無くなり、分化遺伝子の発現が減少した。
- 試したすべての細胞株で効果的であったことから、**A+R**はイヌ**iPS**細胞に普遍に使える培地条件である。
- **AR**培地で培養したイヌ**iPS**細胞は既存のイヌ**iPS**細胞となる遺伝子発現パターンを示した。
- **AR**培地がイヌ**iPS**細胞の機能に影響を及ぼすことはなく、均一な分化誘導を可能とすることが分かった。
- **AR**培地で培養したイヌ**iPS**細胞は既存の培養法に比べ心筋細胞へ効率的に分化することが分かった。
- **AR**培地で培養したイヌ**iPS**細胞由来心筋細胞は拍動し、均質な拍動リズムを刻むことが分かった。

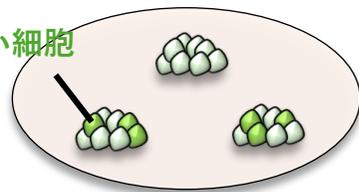
概要図

多能性遺伝子 (Nanog)
蛍光レポーター細胞株
(緑)



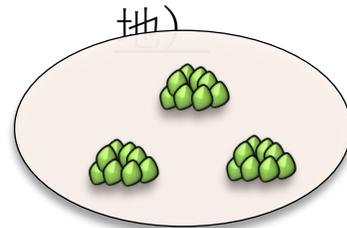
従来の培養法

多能性が高い細胞

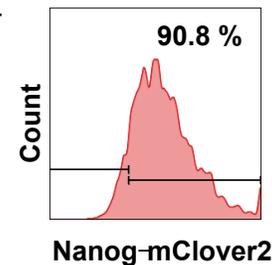


多能性遺伝子の発現
が高い細胞と低い細胞が混在

今回発明した培養法 (A+R培地)



90%以上が多能性遺伝子の
発現が高い細胞



心筋細胞への
分化誘導

A+R培地のみで拍動する心筋細胞が出現

A+R培地の特徴

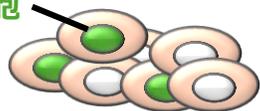
- ・凍結・解凍時にも安定
- ・分化遺伝子の発現消失
- ・培養が難しい細胞株も容易に培養
- ・心筋細胞への効率的な分化誘導
- ・分化誘導時に均一した細胞集団



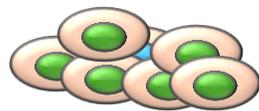
概要図

従来の培養法

多能性が高い細胞

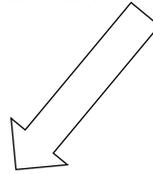
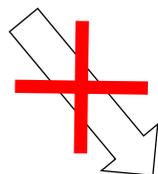


今回発明した培養法 (AR培地)



多能性遺伝子の発現
が高い細胞と低い細胞が**混在**

90%以上が多能性遺伝子の
発現が高い細胞



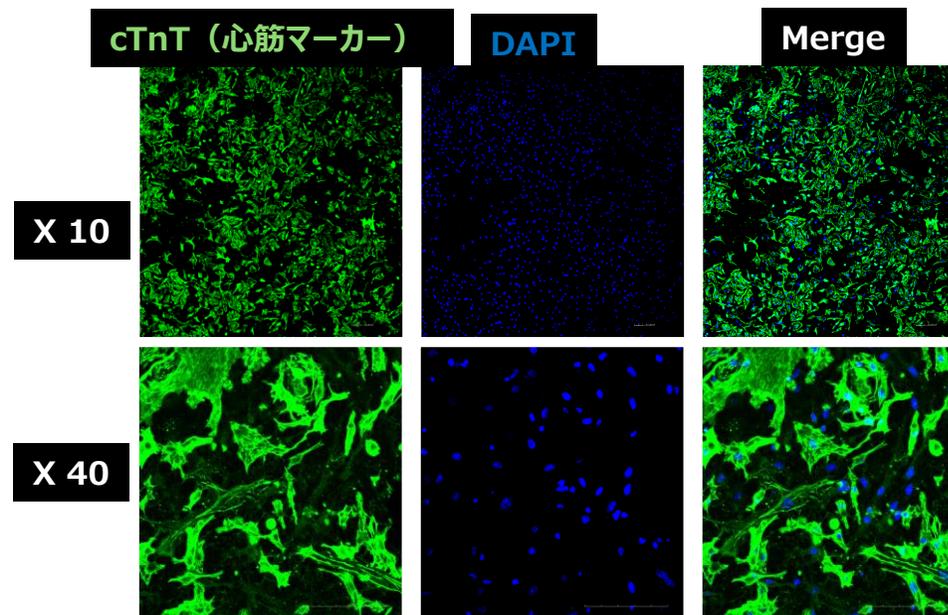
AR培地でイヌiPSを効率よく作成・維持



拍動する心筋細胞が出現

本発明を起点とした、犬再生医療に期待

これまで困難だったイヌiPS細胞の安定的かつ効率的な作製が、AR培地の使用で可能となりました。結果、凍結・解凍時の安定性や分化遺伝子の発現消失、培養困難な細胞株の容易な培養、心筋細胞への効率的な分化誘導、さらに分化誘導時の均一な細胞集団の形成が実現しました。



AR培地で培養したイヌiPS細胞からできた心筋細胞の多くは、心筋マーカー (cTnT) を発現し、拍動を確認した。一方、既存培地では、拍動細胞はできていない。