

イヌにおける再生医療の実現とその戦略

誌名	畜産の研究 = Animal-husbandry
ISSN	00093874
著者名	中里,文昭 杉村,智史 山城,秀昭 菅原,淳史 諸白,家奈子 成田,香里 西森,克彦 紺野,耕 吉田,宗芳 佐藤,英明
発行元	養賢堂
巻/号	61巻6号
巻号補足	
掲載ページ	p. 675-678
発行年月	2007年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



イヌにおける再生医療の実現とその戦略

中里文昭*・杉村智史*・山城秀昭*・菅原淳史*・諸白家奈子*・成田香里***・西森克彦**・紺野耕***・吉田宗芳***・佐藤英明*

1. はじめに

現在、治療の不可能な疾患に対する新しい治療法になる画期的な技術として、再生医療が注目されている。これまでは薬剤で病態の進行を抑制するのみであった疾患を完治できる可能性があり、またドナー数の限られている臓器移植に代替する治療法にもなると期待されている。再生医療は、細胞の移植や活性化によって、欠損した組織を機能的・形態的に回復させる治療法であるが、これまで主に幹細胞を用いた細胞移植の研究が活発に行われてきた。幹細胞とは多分化能と自己複製能を持ち、1種類の幹細胞から数種の組織細胞に分化誘導可能な細胞である。幹細胞はES細胞（胚性幹細胞）と体性幹細胞に大別される。しかし、ES細胞は、分化誘導が報告された細胞種が少なく分化制御が困難であり、また卵子を大量に必要とするなどの樹立に関する困難さから、細胞移植に臨床で用いられるのは体性幹細胞である。体性幹細胞を体外培養して必要な細胞を作製し移植することで、損傷した組織の機能が向上することが数多く報告されている。

再生医療は幹細胞の持つ自己複製能を利用した治療法であるため、構造が複雑な組織に利用することは困難であるが、皮膚や骨などの構造が簡単な組織の再生医療はヒトを対象として臨床応用が開始されている。しかし、再生医療は新しい技術であるためヒトに利用するには、申請等の手続き、倫理性の確保、再生医療の安全性や有効性の確保などに関する包括的なガイドラインの策定が必要である。日本ではガイドラインの制定が遅れていることが原因の一つとなり、再生医療の臨床応用はなかなか普及しないのが現状である。そのため、厳密なガイド

ラインの必要のない他種動物へ再生医療の利用を考えることも必要であると考えられる。現在では伴侶動物においてもヒトと同等のレベルの治療を望む飼い主が多いため、伴侶動物のための再生医療は大きな需要が期待できる。なかでも最も大きな需要が予想されるのがイヌである。イヌはわが国で最も多く飼われている伴侶動物であり、警察犬・介助犬として社会的に貢献する個体の治療はとくに重要である。そこで、イヌに再生医療を利用する場合、どの組織が最適であるか考える必要がある。以下に私たちの考えを紹介したい。

2. イヌ再生医療のターゲット

再生医療を行う対象として適している組織の条件として、①治療法がない疾病が存在すること、②実用化すれば需要があること、③実現の可能性があること、などが挙げられる。これらの条件を考慮すると次の三つの組織が第一のターゲットになると考えられる。

1) 角膜

角膜は眼球の最も外側に位置する透明な組織であり、表層から順に角膜上皮、角膜実質、デス膜、角膜内皮から構成される。角膜上皮の再生医療はヒトやイヌにおいてすでに臨床応用されている。一方の眼が健康である場合は、そちらから角膜上皮幹細胞を採取し、体外培養後に患部に移植する。両目ともに角膜混濁している場合には、口腔粘膜上皮幹細胞を採取し再生角膜シートとして移植する方法が開発されている。実際に、この治療法による視力の回復が報告されている¹⁾。イヌは角膜を引っ掻く傾向があり、角膜の疾患はイヌの眼病において最も多くみられる疾患のひとつである。角膜疾患の中で頻度が高く重篤であるのが角膜潰瘍である。角膜潰瘍は外傷や遺伝的要因などにより角膜に炎症が起こり、部分的に欠損あるいは壊死して潰瘍化する疾患である。パグ・シーザー・キャバリアなどの短頭種

*東北大学大学院 農学研究科 動物生殖科学分野 (Fumiaki Nakazato・Satoshi Sugimura・Hideaki Yamashiro・Atsushi Sugawara・Kanao Morohaku・Eimei Sato)

**東北大学大学院 農学研究科 分子生物学分野 (Katsuhiko Nishimori)

***日本動物専門学院付属イヌ科動物科学研究所 (Kaori Narita・Tsutomu Konno・Muneyoshi Yoshida)

に頻発する。放置すると失明の危険もある。角膜潰瘍はその進行度により、①角膜上皮が部分的に欠損した表在型、②角膜実質まで欠損した深部性角膜潰瘍、③デスメ膜の突出がみられるデスメ膜瘤に分類される。中でも表在型のうち、角膜上皮が再生しても実質部に接着しにくくなるケースは治療が困難である。現在は、点眼や外科手術により治療するが、角膜の一部に白濁が残る場合が多い。角膜上皮が欠損する表在型角膜潰瘍では、角膜上皮の再生は可能であるため再生医療を用いた治療が期待できる。これまでは、角膜上皮シートの作製に正常な角膜上皮が2mm²必要であったが、1個の角膜幹細胞から角膜上皮組織の作製が可能であるという報告がなされている(山上聡ら、第6回日本再生医療学会、2007年)。これにより角膜上皮にわずかでも正常部位が残っていれば治療できる可能性が示された。角膜実質においても、ブタの角膜から他種動物に移植できる可能性のある角膜実質が作製されている。その方法としては、ブタの角膜から角膜実質(透明なコラーゲン中に細胞が分散した構造をしている)のみを取り出して樹脂製の袋で包み、高圧処理により角膜実質中のブタ細胞を死滅させる。このように作製した角膜実質を他種の動物に移植すると、周囲に残存した患者の細胞がコラーゲン内部に入ることにより、角膜実質として機能するようになる可能性があるという(岸田晶夫ら、第28回日本バイオマテリアル学会、2006年)。また、成体ヒトから角膜実質と角膜内皮それぞれの前駆細胞が発見されており^{2,3)}、体外培養により角膜内皮シートの作製に成功している。デスメ膜の再生はまだ報告されていないが、角膜は構造が簡単な組織であるため幹細胞の発見や他の細胞からの分化誘導が可能となれば、より深部にまで達した潰瘍の治療の実現もおおいに期待できる。

2) 神 経

交通事故や椎間板ヘルニアなどにより神経が損傷するケースは多く、最も需要が多いのは神経の再生と予想される。遺伝性のてんかんも神経の疾患である。また、イヌの長寿化により老犬のアルツハイマーも増加している。神経の再生においても角膜の場合と同様に、細胞移植による治療を試みた研究が行われている。カニクイザルのパーキンソン病モデルを用いた実験ではカニクイザル ES 細胞から作製

したニューロン産生細胞の移植で効果が確認されている⁴⁾。また、脊髄損傷のヒトへの骨髄細胞の自家移植が、2006年に臨床で行われている。また、ヒト ES 細胞をドーパミン産生細胞に分化誘導することが成功しており、機能的な神経細胞の体外での作製も可能である⁵⁾。しかし、神経は非常に繊細な組織であるため、患部に神経細胞を移植することで効果が確認された報告は少ない。一方、成人においても神経細胞は新生することが明らかとなった⁶⁾。このことから、神経の再生医療研究は中枢神経を標的とした増殖因子の投与、あるいは増殖阻害因子の働きを抑制する因子の投与による体内での幹細胞の増殖を誘起させる方法に注目が集まりつつある。たとえば、脊髄損傷の原因である神経再生を阻害するタンパク質の一つ、セマフォリン 3A の働きを抑制する SM-216289 というカビの分泌物が発見された。この物質を1ヶ月投与することで脊髄損傷のラットは後肢関節を自ら動かせるまで回復したという⁷⁾。また、マウスを用いた実験で、骨髄間質細胞から抽出されたガレクチン1というタンパク質には神経幹細胞を増殖させる作用があることも報告されている⁸⁾。これらの研究は、細胞移植と組み合わせることでイヌにおいても相乗的な治療効果が期待できることを示唆している。末梢神経の再生についてはイヌにおいても報告があり、腓骨神経断裂の接合に成功し、歩けなかったイヌが正常歩行をするまでの回復をみせている⁹⁾。神経の再生医療には臨床応用できるほどの成果は上がっていないが、治療法のない疾患が多く、神経疾患にかかっているイヌは多いため神経の再生はイヌ再生医療について最も重要な課題である。

3) 皮 膚

火傷や事故により皮膚組織が失われ、移植が必要なケースがイヌにおいても多い。皮膚は再生医療の分野で最も臨床応用が進んでいる組織であり、ヒトにおいては培養皮膚の作製が確立されている。患者から切手大ほどの皮膚断片を採取し、酵素処理により真皮層と表皮層を分離し、それぞれを別々に培養する。培養した真皮層をフィブリン包埋し、その上に培養した表皮細胞を播種し皮膚を3次元的に再構成するのである。このように作製した3次元培養皮膚は、重度の火傷患者への移植で優れた効果を上げている。重度の皮膚損傷については皮膚移植しか治

療法がないため、イヌにおいても3次元培養皮膚が作製されれば有効な治療法となる。

3. 単一割球からの ES細胞株の樹立

ヒトES細胞を用いた再生医療において、ES細胞の樹立により胚が破壊され、それ以降の発生能が奪われるということが大きな問題となっている。イヌにおいてもヒトに準じた倫理的配慮が必要である。最近、この問題を解決するために着床前遺伝子診断と同様の方法を用いて、胚の発生能を阻害せずにES細胞株を樹立する方法がマウスにおいて報告された¹⁰⁾。はじめに8細胞期胚から割球を一つ取り出し、その割球をGFP標識したES細胞と共培養して細胞塊を得た。この細胞塊をES細胞成長培地に移して2~4日間培養後、ES細胞由来の細胞を完全に除去し、割球由来の部分から4系列のES細胞株を得た。割球由来のES細胞は正常な核型を示し、Oct-4などの多能性マーカーを発現した。また、*in vitro*において3胚葉すべてに由来する細胞に分化し、体内に注入した際に形成された奇形腫も3胚葉すべてに由来する細胞を含んでいた。さらに、このES細胞を胚盤胞期胚に注入して得たキメラ個体の産子を調べることで、このES細胞が生殖系列に移行することが確認された。なお、1割球を除去された胚を仮親に移植して発生率を調べたところ、正常胚とほぼ同率であった。以上のことから胚を破壊することなくES細胞を樹立できる可能性が示された。これはマウスにおける報告であるが、生命を犠牲にしてES細胞を樹立することへの批判を回避できる興味深い方法である。

その後、同じ研究チームがほぼ同様の手法でヒトにおいて胚を破壊することなくES細胞を樹立することに成功した¹¹⁾。この報告では、材料として不妊治療の目的で作製された余剰胚を用いており、それらの胚から取り出した割球を用いてES細胞を樹立していた。マウスの場合と異なり、割球を除去した胚の個体への発生能、およびES細胞の生殖系列への移行は調査できなかった。しかし、ヒトの割球から得られたES細胞が3胚葉すべてに由来する細胞に分化すること、正常な核型を持つこと、多能性マーカーを発現すること、そして割球を除去された胚の胚盤胞期までの発生率は通常胚とほぼ同じで

あることは確認された。

ES細胞を用いた臨床的な再生医療の報告はほとんどないが、倫理的問題や扱いの困難さが解決されればES細胞は再生医療において有力な材料となる。イヌではES様細胞が報告されており¹²⁾、単一割球からES細胞を樹立する技術をイヌに利用できる可能性がある。着床前遺伝子診断により胚から割球を一つ取り出しES細胞を樹立して凍結保存することで、生後のイヌが病気にかかった際に免疫拒絶の起こらない細胞を迅速に作製し再生医療に用いることが可能となる。また、この報告ではES細胞と共培養することで割球をES細胞に分化させた。すなわち、ES細胞が相互的に未分化な状態を保つ因子を放出していることが示唆された。イヌES様細胞の放出する因子を解析することにより、イヌES様細胞のメカニズムのより深い理解が可能となるだろう。

4. イヌ再生医療の意義

再生医療は、ヒトにおける実現が最も望まれていることは確実である。一方、伴侶動物であるイヌにおいても再生医療は重要である。イヌにおいても現在は治療法のない疾病が存在するので、イヌに再生医療を利用することはイヌと飼い主の幸福につながり、社会への貢献となる。また、イヌにおいては煩雑な法規制はなく臨床応用しやすいと考えられる。さらに、イヌにおいて再生医療が実用段階に発展し安全性が十分に認知されれば、ヒトにおいても再生医療が許容される可能性が高くなり、イヌにおける研究や臨床データをヒトの再生医療に応用可能となる。ヒトにおける研究成果を応用することでイヌでの臨床応用を開始し、さらにイヌでの知見をヒトに応用することで、相乗的な再生医療の進歩が期待できる。再生医療という革新的な技術のヒトへの応用に先立つ前駆的なターゲットとしてイヌは最も適しているといえる。

参考文献

- 1) Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T., Tano, Y.: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351: 1187-96, 2004
- 2) Uchida, S., Yokoo, S., Yanagi, Y., Usui, T., Yokota, C., Mimura, T., Araie, M., Yamagami, S., Amano, S.: Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 1620-5, 2005

- 3) Yokoo, S., Yamagami, S., Yanagi, Y., Uchida, S., Mimura, T., Usui, T., Amano, S.: Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 1626-31, 2005
- 4) Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y., Hashimoto, N.: Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest*, 115: 102-9, 2005
- 5) Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E.D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., Pearce, R.A., Thomson, J.A., Zhang, S.C.: Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23: 781-90, 2005
- 6) Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4: 1313-7, 1998
- 7) Kaneko, S., Iwanami, A., Nakamura, M., Kishino, A., Kikuchi, K., Shibata, S., Okano, H.J., Ikegami, T., Moriya, A., Konishi, O., Nakayama, C., Kumagai, K., Kimura, T., Sato, Y., Goshima, Y., Taniguchi, M., Ito, M., He, Z., Toyama, Y., Okano, H.: A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med*, 12: 1380-9, 2006
- 8) Sakaguchi, M., Shingo, T., Shimazaki, T., Okano, H.J., Shiwa, M., Ishibashi, S., Oguro, H., Ninomiya, M., Kadoya, T., Horie, H., Shibuya, A., Mizusawa, H., Poirier, F., Nakauchi, H., Sawamoto, K., Okano, H.: A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 7112-7, 2006
- 9) Nakamura, T., Inada, Y., Fukuda, S., Yoshitani, M., Nakada, A., Itoi, S., Kanemaru, S., Endo, K., Shimizu, Y.: Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res*, 1027: 18-29, 2004
- 10) Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.J., Johnson, J., Meisner, L., Lanza, R.: Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*, 439: 216-9, 2006
- 11) Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.J., Lanza, R.: Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, 444: 481-5, 2006
- 12) Hatoya, S., Torii, R., Kondo, Y., Okuno, T., Kobayashi, K., Wijewardana, V., Kawate, N., Tamada, H., Sawada, T., Kumagai, D., Sugiura, K., Inaba, T.: Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 73: 298-305, 2006

農業畜産情報

絵本通じ牧場応援—中央酪農会議

中央酪農会議は、くもん出版から絵本『牧場のいのち』を発行した。牧場で生まれ育った小学校6年生の女の子の目を通して、牧場や酪農の仕事などを描き、生命をはぐくむ酪農の素晴らしさを訴えている。牧場の素晴らしさを子どもたちに知ってもらいたいとしている。

小説家・立松和平さんの文に、立松さんの娘・山中桃子さんが絵をつけた。立松さんは「大地にずっと立って生きている牧場の人たちへ、応援の歌を歌いたいという気持ちで書いた」と話す。

絵本の最後には「牛乳を生産する人びとは、『いのちのもと』をつくっています。だからみんな、牧場での仕事に誇りを持っているのです」と酪農家の思いを伝えている。問い合わせは中央酪農会議酪農理解促進室

電話 03-3245-7624。

「みんなの牛乳のうた」

中央酪農会議(中酪)は、牛乳の消費拡大で展開し

ている「牛乳に相談だ。」キャンペーンの一環として、中酪が作詞した「みんなの牛乳のうた」のメロディーを募集している。

歌詞は牛乳の機能性をうたったもので、第1、第2、第3楽章から成る。ホームページで公開されており、「お肌が荒れたら 牛乳に相談だ アミノ酸で お肌は生まれ変わる」など、牛乳の良さをアピールしている。

作曲したメロディーを、CDやMD、カセットのいずれかに録音し、HPからダウンロードした応募用紙とともに送る。未発表のオリジナル楽曲で、第三者の著作権や商標権を侵害せず、公序良俗に反しないものに限る。演奏する楽器の種類は問わない。作品の権利は中央酪農会議に帰属し、優秀曲はイベントで活用する場合がある。

締め切りは5月31日。同日付の消印有効。審査結果は7月初旬に発表する。

送付先は〒100-0004

東京都千代田区大手町1-8-3 JAビル7階、

「牛乳に相談だ。」キャンペーン事務局

「みんなの牛乳のうた」メロディコンテスト係。