

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592950

研究課題名(和文)凍結切片を利用したiPS細胞の効率的分化誘導法および品質評価法の確立

研究課題名(英文)A new induction method for the controlled differentiation of human iPS cells using frozen sections

研究代表者

寺田 知加(Terada, Chika)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：40460216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療において、iPS細胞は細胞源として期待されているが、分化誘導法も品質評価法もいまだ確立されていない。そこで本研究では、再生を目指す組織・臓器の凍結切片上でiPS細胞を培養することで簡便な分化誘導法および品質評価法の確立を目指した。マウスの肝臓、脳、脊髄の凍結切片上にて数種のヒト体細胞由来iPS細胞を培養したところ、肝臓凍結切片上培養群では肝細胞関連分子の、脳・脊髄凍結切片上培養群では神経系細胞関連分子の遺伝子およびタンパク質の発現を有意に認めた。またこれらの誘導効率には各種iPS細胞間での差が認められたことから、分化誘導法として有効でありかつ品質評価法にも有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：iPSCs themselves have some problems that need to be overcome. Briefly, a simple and efficient method has been expected for the induction the differentiation and the evaluation of quality of iPSCs. In this study, we hypothesized that it is possible to induce the controlled differentiation of iPSCs by culturing on frozen sections of every tissue/organ which have the most suitable microenvironment for the induction. As a result, iPSCs which were cultured on liver expressed mRNA and protein for hepatocyte related markers, and iPSCs which were cultured on brain/spinal cord expressed mRNA and protein for neuron related markers, respectively. Moreover, the differentiation efficiency of iPSCs on frozen sections could be different among clones of iPSCs. Judging from these facts, the induction method of human iPSCs using frozen sections could be useful as a simple and effective measure for inducing the differentiation of iPSCs and evaluating the potential and/or quality of iPSCs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医療 iPS細胞 口腔粘膜由来iPS細胞 分化誘導 質の保証

1. 研究開始当初の背景

失われた組織や臓器に対する再生医療は現在最も臨床応用が望まれる研究分野の一つであり、なかでも倫理的問題がなく、ES細胞に匹敵する多能性を有するiPS細胞には大きな期待が寄せられている。ヒトiPS細胞樹立の発表から約3年、実用化へ向け世界各地で競争的資金が多額に投入され、各国が協力・競争し、日進月歩で研究は進んでいる。iPS細胞は、難病の原因究明、治療法の開発を目指した疾患研究、医薬品の安全性試験などへの利用、細胞製剤の開発などの創薬研究、神経や血液、組織や臓器の機能の修復や再生を目指した再生医療などへの応用が期待されているが、実用化に向けては解決すべき課題が多数ある。これまでに、日本を含めた世界各地で有効な分化方法の確立を目指し、その結果が報告されている。ヒトiPS細胞から造血系細胞及び血管内皮細胞を分化誘導したという報告(Chio *et al.* Stem Cells, 2009)、心筋を分化誘導したという報告(Zhang *et al.* Circulation Research, 2009)、運動ニューロンを分化誘導したという報告(Karumbayaram *et al.* Stem Cells, 2009)、様々な神経系細胞を分化誘導したという報告(Chambers *et al.* Nat Biotechnol, 2009)、網膜色素上皮と視細胞を分化誘導したという報告(Hirami *et al.* Neurosci Lett, 2009)、マウスiPS細胞から樹状細胞およびマクロファージを分化誘導したという報告(Senju *et al.* Stem Cells, 2009)、iPS細胞から膵臓インスリン産生細胞を分化誘導したという報告(Zhang *et al.* Cell Res, 2009)などがあげられ、分化誘導法の検討についてめざましい進歩が認められる。しかしながら、これら分化誘導法の確立には多くの増殖・分化因子を用いた検索が不可欠であり、複雑かつ膨大な各種因子の相互作用により細胞から組織・臓器が分化していく生体内環境を明らかにすることはきわめて困難である。さらに分化誘導を目指す細胞によっては、未知の蛋白質の解析が必要となる場合も考えられ、その選択・同定には限界もある。また、現在まで、世界各地で様々な方法で様々な細胞を源としてiPS細胞が樹立されているが、その品質評価法に確立したものはない。同一細胞から樹立したiPS細胞でも、その樹立法や増殖法が違えば分化誘導能に対する反応に差があったり、同時に樹立し、シングルコロニーから分離培養したiPS細胞でも、増殖の過程で各コロニー間に分化誘導能に対する反応に差があったり、さらに、同一コロニー間でもコロニーの中央部と辺縁部の細胞で性格に差があることなどが分ってきている。実際iPS細胞は同じ性質や能力を持つわけではないことが明らかとなっており、同じ体細胞か

ら同じ方法で樹立したiPS細胞も個々のコロニー毎にさまざまな機能細胞への分化のしやすさに違いがある。つまり品質が安定しておらず、これらのiPS細胞を生体に臨床応用するためにはその質の評価が必要であるが、その方法はいまだ確立されていない。今後iPS細胞研究を加速するためには、世界中の何処の研究室においても同等の品質を保持するiPS細胞を効率よく作製する必要がある。そのためには培養法、作成法、分化方法、保存法、管理法についての世界的な標準化が必要であり、樹立されたiPS細胞を評価する方法と基準についても検討が必要である。

そこで本研究では分化誘導因子を実際に再生を目指す組織・臓器に求めることで、iPS細胞の効率的な分化誘導を目指すとともに、その評価法を確立し、さらに困難な因子の同定を効率的かつ簡便に行えるのではないかと、まったく新たな方法の確立を試みた。

2. 研究の目的

現在めざましい進歩を続けるiPS細胞研究であるが、効率的で確実な分化誘導法の確立と樹立されたiPS細胞の質の評価法の確立は最も解決が待たれる問題点である。そこで本研究では、実際に再生を目指す組織・臓器の凍結切片上でiPS細胞を培養することで、それぞれの組織・臓器の機能細胞に最適な細胞外基質と分化因子を効率的かつ確実にiPS細胞に作用させることができる新たなiPS細胞の分化誘導法を確立するとともに、この方法を用いて、iPS細胞コロニー毎の分化能の違いを明らかにし、さまざまな組織・臓器の再生に利用できる最適なコロニーの選別を検証することにより、新たなiPS細胞の質の評価法の確立を目指す研究である。

3. 研究の方法

本研究では年齢・性別を問わず、外観を損ねることなく簡単に採取可能で、採取部位の創傷治癒が早く癒痕がのこらず、何度でも採取可能であるというメリットのある口腔粘膜よりiPS細胞を作製、使用した。

(1)ヒト口腔粘膜由来iPS細胞を再生を目指す組織・臓器の上で培養し、直接的に各種増殖・分化因子を作用させ、効率的かつ確実に分化させるという新たな分化誘導法の確立の検討、(2)誘導後iPS細胞に対する分化誘導効率の検討とその分子細胞生物学的検討、(3)分化誘導に対するiPS細胞それぞれのコロニー間での差を比較検討し、その性格を分子細胞生物学的に詳細に検討することにより新たなiPS細胞評価法の確立の検討をおこなうことで、新たな評価法が確立できるか検討する。

4. 研究成果

雄性 6 週齢 ICR マウスより摘出した肝臓、脳、脊髄の凍結切片上にてヒト体細胞由来 iPS 細胞を 9 日間培養した。

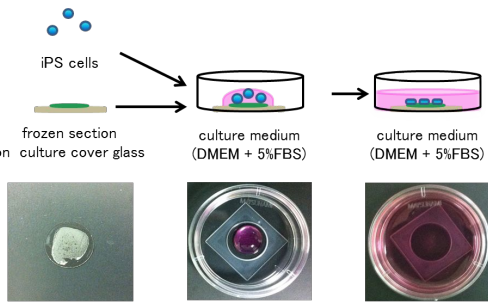


Fig.1 凍結切片上でのiPS細胞の培養方法の模式図

その結果、培養期間中に細胞形態の変化が認められた。コントロール群では広がった iPS 細胞が、様々な形態を呈し統一性が認められないのに対し、肝臓群では比較的大型で多角形の形態を呈する細胞が認められ、脳群、脊髄群では複数の細長い突起を有する神経細胞様形態を呈する細胞を多数認めた。

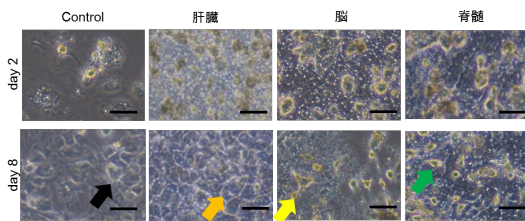


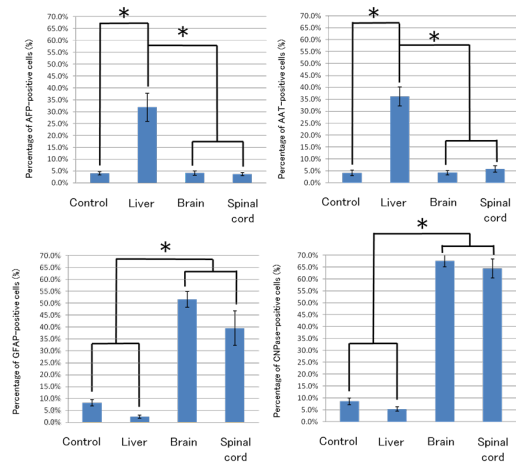
Fig.2 培養中のiPS細胞の位相差顕微鏡像

そこで これらの細胞の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討したところ、コントロール群では、未分化細胞マーカーといくつかの肝細胞、神経系細胞マーカーの発現が認められた。肝臓群では未分化細胞マーカーは消失し、神経系細胞への分化が抑制され、一方肝細胞への分化は維持されていた。脳群、脊髄群では肝臓群の場合と同様に、未分化細胞マーカーの発現が消失し、肝臓群の場合とは逆に肝細胞への分化が抑制され、神経系細胞への分化は維持されていた。

		Control	肝臓	脳	脊髄
未分化細胞マーカー	Nanog	+	-	-	-
	Oct3/4	+	-	-	-
肝細胞マーカー	Sox17	+	+	-	-
	FoxA2	+	+	-	-
	AFP	+	+	-	-
	AAT	+	+	-	-
	ALB	+	+	-	-
CYP3A4	-	-	-	-	
神経系細胞マーカー	Nestin	+	-	-	-
	MBP	-	-	+	-
	CNPase	+	-	+	+
	GFAP	+	-	+	+
	NF-200	+	-	-	-
Tuj-1	+	-	-	-	

Fig.3 凍結切片上培養iPS の遺伝子発現

さらに免疫細胞化学的手法を用いて、肝細胞、神経系細胞マーカーのタンパク質発現を確認した。また、その結果より全有核細胞数に対する陽性細胞数を測定し、分化誘導効率の差を評価した。その結果、コントロール群では肝細胞、神経系細胞マーカーともに陽性細胞率が低いのに対し、肝臓群では肝細胞マーカーの陽性細胞率が有意に高く、また脳群、脊髄群では神経系細胞マーカーの陽性細胞率が有意に高く認められた。



以上の結果より、本法による iPS 細胞の肝細胞、神経細胞への分化誘導が可能であることが示唆された。

さらに、異なる体細胞由来の iPS 細胞や異なる樹立方法の iPS 細胞を用いて本誘導法を行い、同様に陽性細胞数の割合について検討した。その結果、全ての iPS 細胞株において、肝臓群では肝細胞マーカーの陽性細胞率が有意に高く、また脳群、脊髄群では神経系細胞マーカーの陽性細胞率が有意に高く認められた。

		TIPS30	HPS0077	HPS0063	HPS0076
origin		oral mucosa	dental pulp	skin	skin
gene expression		retrovirus vector	episomal vector	retrovirus vector	episomal vector
foreign gene		Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53 shRNA	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53 shRNA
AFP	Control	4.03%	13.82%	17.59%	10.53%
	Liver	31.88%	42.01%	42.67%	34.35%
	Brain	4.15%	3.31%	5.65%	6.07%
	Spinal cord	3.70%	6.80%	7.07%	6.25%
AAT	Control	4.19%	2.51%	4.72%	4.09%
	Liver	36.19%	27.82%	42.20%	27.07%
	Brain	4.24%	5.17%	5.25%	6.47%
	Spinal cord	5.80%	2.69%	4.32%	4.22%
GFAP	Control	8.57%	4.00%	4.48%	3.34%
	Liver	2.39%	3.03%	2.57%	3.99%
	Brain	51.64%	51.30%	47.23%	55.51%
	Spinal cord	39.57%	51.01%	29.83%	37.75%
CNPase	Control	8.59%	2.89%	9.25%	3.10%
	Liver	5.37%	1.62%	2.51%	2.89%
	Brain	67.66%	51.63%	46.02%	54.39%
	Spinal cord	64.39%	42.72%	32.18%	39.95%

Fig.4 4つのiPS細胞株における誘導効率の差

このことから、本誘導法により普遍的に iPS 細胞を高率に分化誘導できることが示唆された。また、それぞれの iPS 細胞株において陽性細胞率に差を認めたことから、iPS 細胞の品質評価法としても有用である可能性が示唆された。本誘導法は、新たな視点に立った簡便な iPS 細胞の分化誘導法であると考

えられる。さらに本誘導法を応用することにより iPS 細胞の未分化状態や分化誘導刺激に対する反応性の差を評価することも可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 5 件)

Susumu Tadokoro, A new induction method for the controlled differentiation of human iPS cells using frozen sections. International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting、2014.6.18-21、Vancouver

田所 晋、凍結切片を用いた iPS 細胞の新たな分化誘導法および品質評価法の確立、第 14 回日本抗加齢学会総会、2014.6.6-8、大阪国際会議場

田所 晋、凍結切片を用いた iPS 細胞の新たな分化誘導法および品質評価法の確立、第 13 回日本再生医療学会総会、2014.3.4-6、国立京都国際会

田所 晋、凍結切片を用いた iPS 細胞の新たな分化誘導法および品質評価法の確立、第 78 回鶴見大学歯学会例会、2013.12.21、鶴見大学会館メインホール

田所 晋、A new method for differentiation induction and quality evaluation of iPS cells using frozen sections. 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2013.10.11-13、福岡国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺田 知加 (TERADA Chika)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：40460216

(2)研究分担者

里村 一人 (SATOMURA Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

佐藤 徹 (SATO Toru)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：30170765

徳山 麗子 (TOKUYAMA Reiko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20380090

(3)連携研究者
なし