

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15114

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞の奇形腫を介した分化細胞の誘導法開発と病態解明への応用

研究課題名(英文) Development of induction method of differentiated cell via teratoma of human iPSC cell and its application to elucidation of pathology

研究代表者

松村 耕治 (MATSUMURA, Kouji)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部共同利用研究施設・講師)

研究者番号：30272610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：奇形腫を利用した新たな誘導法を開発した。方法は、ヒトiPS細胞(hiPSC)をSCIDマウスへ移植、奇形腫細胞から表面マーカーでソーティング、培養である。CD34陽性細胞を血管内皮細胞培地で培養するとCD31、CD144陽性の血管内皮細胞が出現した。また、抗線維芽細胞抗体陽性細胞は線維芽細胞抗原の発現が認められた。ソーティング後のCD56 (NCAM) 陽性細胞は神経前駆細胞様で、神経突起を含む分化細胞が認められた。以上、hiPSCの奇形腫細胞を細胞マーカーでソーティングすることで分化誘導細胞を取り出した。このin vivo分化誘導法は、誘導が難しい分化細胞の単離を可能にすると考えられた。

研究成果の概要(英文)：A new induction method using teratoma was developed. The method is transplanting human iPSC cells (hiPSC) to SCID mice, sorting from teratoma cells with surface markers, and culturing. When CD34 positive cells were cultured in vascular endothelial cell medium, CD31, CD144 positive vascular endothelial cells appeared. Moreover, expression of fibroblast antigen was observed in anti-fibroblast antibody positive cells. CD56 (NCAM) positive cells after sorting were neural progenitor-like cells, and differentiated cells including neurites were observed. Thus, differentiation-induced cells could be removed by sorting hiPSC teratoma cells with cell markers. This in vivo differentiation induction method was thought to make it possible to isolate differentiated cells that are difficult to induce.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 奇形腫 ソーティング 細胞培養 分化 血管内皮細胞 線維芽細胞 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞を分化誘導して様々な研究が行われているが、神経、網膜、心筋等の細胞に限定され、より多くの分化細胞への誘導が望まれている。斬新な着想として、ヒト iPS 細胞から奇形腫を作り、その中に含まれる分化細胞を分取(ソーティング)することで新しい種類の分化細胞を利用でき、これまで解析が困難であった病態解明の研究に役立つ。

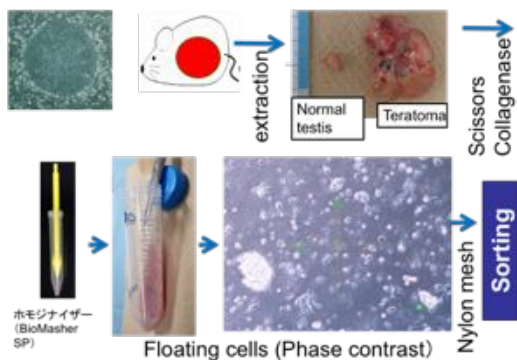
2. 研究の目的

- (1) ヒト iPS 細胞由来の奇形腫をマウスで作成して細胞を単離する
- (2) 単離細胞から表皮、線維芽細胞、軟骨、腸管や気管支粘膜細胞、平滑筋、等を分取及び維持する
- (3) 分取した細胞が元の iPS 細胞の遺伝子変異を維持していることを確認、それらの分化細胞を利用した病態解明の細胞の供給源とする

3. 研究の方法

- (1) iPS 細胞をマウスに移植して作成された奇形腫から表皮、神経、グリア、軟骨、平滑筋、呼吸器上皮、消化管上皮、線維芽細胞、等の分化細胞をフローサイトメトリーで分取、維持
- (2) 研究の前提として、奇形腫由来の分化細胞が、元の iPS 細胞の遺伝子変異を引継ぎ、あるいは、一般的に行われている *in vitro* で分化誘導した細胞と類似しているか調べる
- (3) 奇形腫を介した疾患由来の分化細胞で病態解明を行う

Cell Preparation for Sorting



1. hiPSCをSCIDマウスの精巣へ移植後に発生する奇形腫を摘出
2. mRNA解析により細胞種の同定(RT-PCR)
3. 組織の細胞単離を行う。ナイロンメッシュ(200µm~50µm)、ホモジナイザー(約1細胞分の空隙有り)を利用
4. 適切な表面マーカー抗体でFACSにより細胞解析、一部はソーティング
5. ソーティング細胞は、培養及び分化誘導後、細胞を単離

4. 研究成果

(1) 奇形腫の作成

未分化の iPS 細胞を免疫不全マウスへ移植すると奇形腫が発生する。この細胞が内、中、

外胚葉へ分化する多能性の確認である。我々の作成した奇形腫は、表皮、神経細胞、軟骨、平滑筋、呼吸器上皮、消化管上皮、等の細胞がみられ、ヒトの自然発生的な奇形腫と類似している (図 1)。RT-PCR による解析は、表皮、

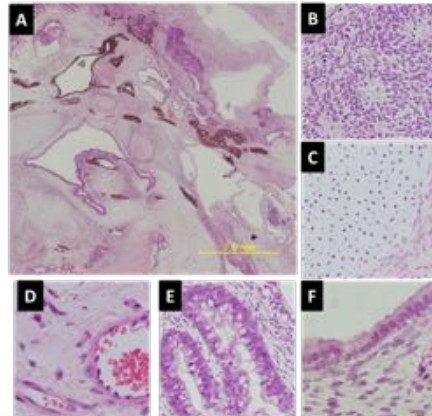


図1. ヒトiPS細胞由来の奇形腫と構成する細胞:
A. 低倍像, B. 神経前駆細胞, C. 軟骨細胞, D. 血管平滑筋および線維芽細胞, E. 腸管上皮細胞, F. 呼吸器上皮細胞

消化管上皮、神経、血管幹細胞、中胚葉細胞の遺伝子発現が認められた (図 2)。この奇形腫から分化細胞を単離して再生医療、病態解明、薬剤開発等への研究利用を行う。

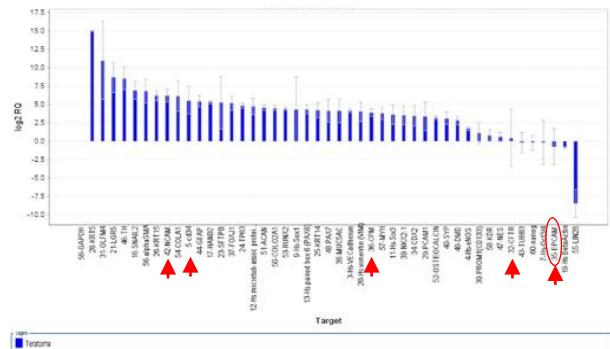


図 2. 奇形腫に発現した遺伝子。赤矢印はソーティングに利用した表面マーカー抗体遺伝子 (GAPDH をコントロール遺伝子として、iPS 細胞の発現を 1 として奇形腫の発現。Δ Δ Ct 法)。

(2) 神経細胞の分離培養

外胚葉系細胞マーカーでの奇形腫に含まれ

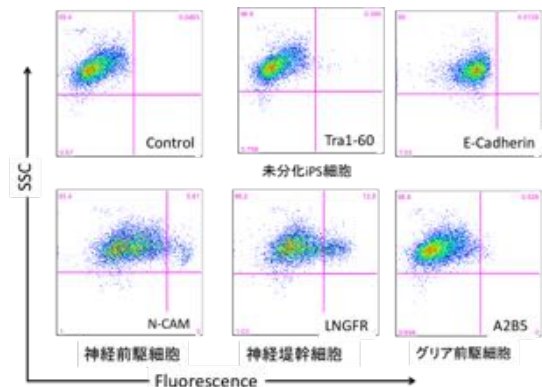


図3. 外胚葉マーカーによる奇形腫細胞の解析

る細胞の解析をフローサイトメーターで行った。神経前駆細胞が多く認められた。一方、未分化 iPS 細胞の残存や上皮接着マーカーやグリア細胞は認められなかった。この結果より、ソーティング、培養の対象の一つとして神経前駆細胞を選択した (図 3)。NCAM 抗体陽性細胞は、3 日から 1 ヶ月にかけて細胞は増殖して、一部の細胞が多形の細胞へ変化して、細胞突起も出現した (図 4)。神経細胞マーカーの β チューブリンが陽性を示した (図 5)。

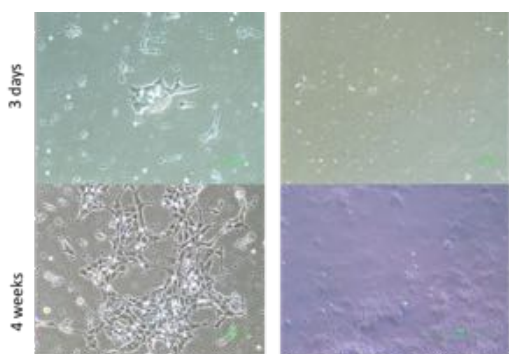


図4. N-CAM陽性Sorting 細胞を神経誘導培地にて培養

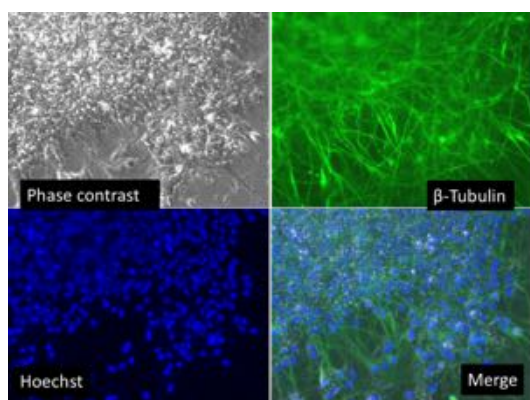


図5. N-CAM陽性Sorting 細胞を神経誘導培地にて培養 (60日間)

(3) 中胚葉系細胞マーカーによる奇形腫細胞の解析

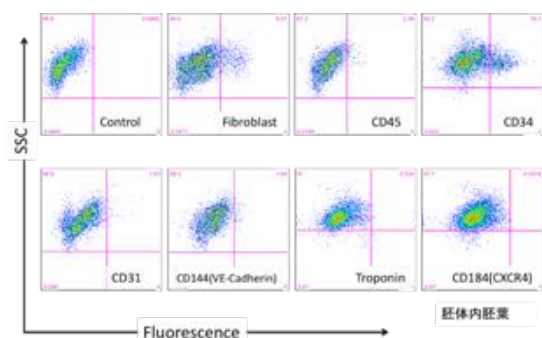


図6. 中胚葉/内胚葉マーカー

中胚葉系細胞マーカーでの奇形腫に含まれる細胞の解析を行った。線維芽細胞が多く含まれていたためソーティング、培養の対象とした。血球や CD34 細胞も認められた。一方、血管内皮や心筋細胞は少なく、内胚葉マーカー陰性であった (図 6)。

(4) 線維芽細胞の分離培養

線維芽細胞抗体陽性細胞は、紡錘形を示し、細胞増殖も認められた。継代培養も行い、ソーティング後 30 日の細胞を示す。紡錘形の細胞はほとんどが線維芽細胞陽性を示した (図 7)。

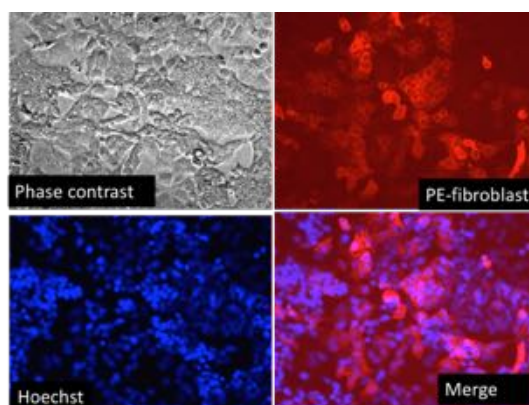


図7. ソーティング線維芽細胞の培養(30日間)

培養した線維芽細胞はヒト特異的抗体 (HuNu) にすべて陽性であった。移植したヒト iPS 細胞由来であることの確認ができた (図 8)。

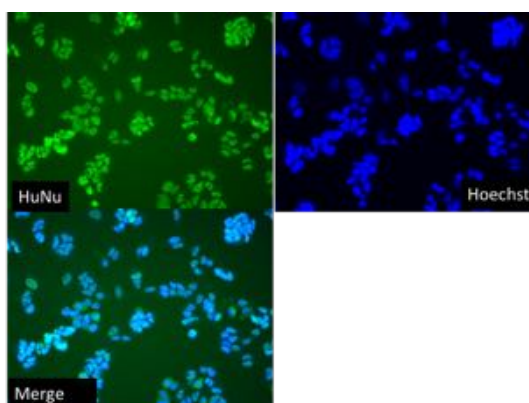


図8. ソーティング線維芽細胞のヒト細胞由来の確認

(5) 血管内皮細胞の分離培養

未分化血管内皮マーカー (CD34) を用いて細胞単離した奇形腫細胞からソーティングを行った。生きた細胞を選び (7-AAD)、ダブレット細胞も除去した (図 9、神経細胞、線維芽細胞も同様にダブレット細胞は除去している)。

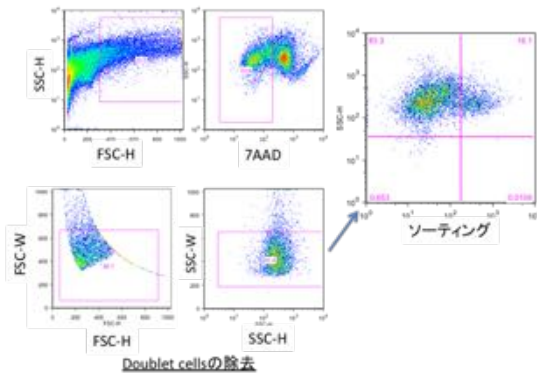


図9. 血管内皮細胞のソートリング (CD34)

血管内皮細胞特異的な培地 (EBM2) を利用して約 1 ヶ月培養したところ、血管内皮細胞に特異的な抗体 (CD144) の細胞が多くを占めた (図 10)。RT-PCR にて奇形腫に CD34 の発現の

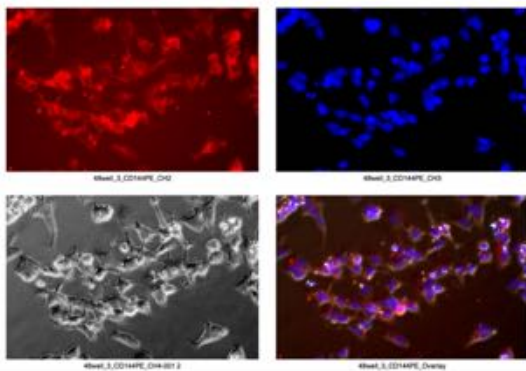


図10. 血管内皮細胞培地で培養(約1ヶ月)

増加が見られた。一方、CD34(+)ソートリング細胞には内皮細胞の特異的なマーカーの CD31, VE-cadherin (CD144) の発現が認められた (図 11)。

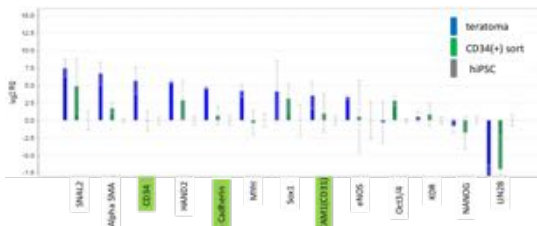


図11. RT-PCR法により奇形腫、CD34(+)ソートリング細胞、hiPSC から抽出したmRNAの発現。(ΔΔCt解析。GAPDHをコントロール遺伝子、hiPSCサンプルの発現を1として相対的に示した。N=3)

(6) 腸管上皮、肺気管支上皮の分離培養

奇形腫細胞の分離培養は適切な表面マーカー抗体を利用するが、表皮、粘膜などの表面マーカーは限られている。上皮細胞接着分子 EpCAM、ヒト腸管上皮発現の CFTR、気道線毛上皮等の前駆細胞 (CPM) を入手して奇形腫細胞を解析したところ、これらの陽性率が 10% 前後現れた。そこで、分化細胞の分離を目指してソートリング、培養を行っている (図 12)。

現在、これらのソートリング細胞を腸上皮培地、ヒト表皮ケラチノサイト培地で培養を行うも、前者の培地では活発な細胞増殖が認められたが、後者のケラチノサイト培地では

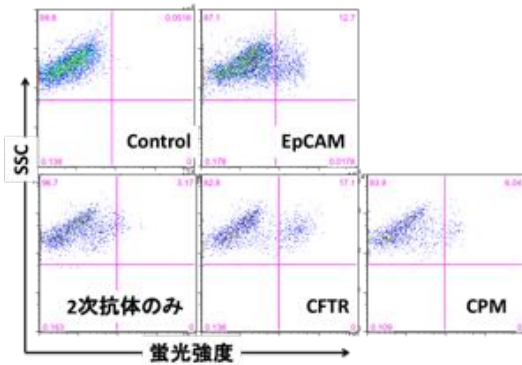


図12. 奇形腫の上皮細胞陽性率、上皮細胞接着分子EpCAM、ヒト腸管上皮発現のCFTR、気道線毛上皮等の前駆細胞(CPM)。EpCAMは蛍光直接標識。CFTR、CPMは未標識抗体で2次抗体にAlexa488標識抗マウス抗体を利用。

細胞は増殖しない (図 13)。EpCAM 抗体が正常な腸管上皮をソートリングしたか否か、RT-PCR や特異的な抗体で調べる。

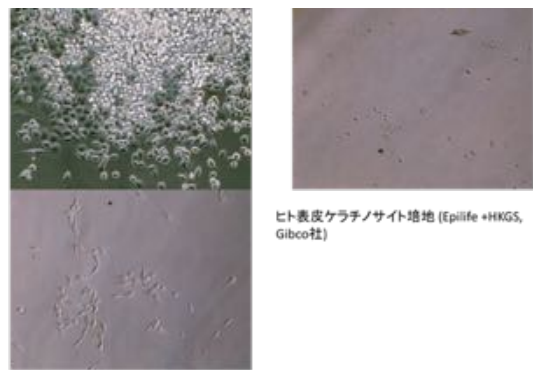


図13. EpCAM抗体による奇形腫細胞のSorting (2週後)

(7) 展望

以上、in vivo 誘導法として、神経細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞は、表面マーカーと専用培地で得られた。通常の in vitro 誘導法では、現在、オルガノイドとして幹細胞、腸幹細胞、一部、CPM 抗体を利用した肺胞細胞の細胞誘導が行われている (表 1)。しかし、分化誘導が十分に行われていない表皮 (ケラチノサイト)、消化管上皮 (腸)、気道上皮/肺胞細胞は適切な表面マーカーで in vivo 細胞単離できる可能性が示唆された。

表1. 主なヒトiPS細胞の分化誘導

細胞	分化誘導法		抗体
	in vitro	奇形腫から	
脳神経	○	○	NCAM
脊髄神経	○		
網膜	○		
表皮	△	○	EpCAM
内耳	△		
歯	△		
心筋	○		
軟骨	○	△	
血管内皮	○	○	CD34
平滑筋	△	△	
骨格筋	○		
造血細胞	○	○	
血小板	○		
線維芽細胞	△	○	REA165
消化管	△	○	CFTR
気道上皮	△	○	CPM
膵臓(β細胞)	△		
腎臓	△		
肝臓(オルガノイド)	○		

○: 実行、○: 実行予定、△: 未完成

→Epcamへ変更

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 1 件)

- ① Yoshida K, Tsujimoto H, Matsumura K et al. (3/7) : CD47 is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in gastric cancer. *Cancer Medicine*. 4 (9) : 1322-1333, 2015. (査読有り)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 松村 耕治, 市来 やよい, 池田 文彦, 新井 仁明, 小賀 厚徳, 石原 雅之, 石原 美弥. ヒト iPS 由来の奇形腫からセルソーティングによる分化誘導細胞の単離の試み: 第 28 回日本サイトメトリー学会, お茶の水, 2018.05
- ② Kouji Matsumura, Yui Umeyama, Yayoi Ichiki, Masaaki Arai, Hiroshi Mizuno, Miya Ishihara. Development of in vivo differentiation induction method of human iPS cells - Isolation of vascular endothelial cells, nerve cells and fibroblasts by sorting cells derived from teratoma: *Cira 2017 International Symposium, Kyoto, Japan*, 2017. 11
- ③ 新井 仁明, 今村 宰, 松村 耕治, 伊達木 穰, 瀧嶋 邦夫. Upregulation of SROB1 is associated with neuronal apoptosis following traumatic brain injury. *生化学会*, 神戸, 2017. 12
- ④ 松村 耕治, 梅山 悠伊, 市来 やよい, 小賀 厚徳, 水野 博司, 石原 美弥. in vivo 分化誘導法による血管内皮細胞の単離-ヒト iPS 細胞由来の奇形腫のソーティング: 第 27 回日本サイトメトリー学会, 神戸, 2017. 06
- ⑤ 松村 耕治, 梅山 悠伊, 市来 やよい, 櫛引 俊宏, 石原 雅之, 水野 博司, 石原 美弥. ヒト iPS 細胞の奇形腫を介したソーティングによる血管内皮細胞等の分化誘導細胞の単離: 第 16 回日本再生医療学会, 仙台, 2017. 03
- ⑥ 松村 耕治, 梅山 悠伊, 市来 やよい, 小賀 厚則, 新井 仁明, 石原 雅之, 水野 博司, 石原 美弥. ヒト iPS 細胞の奇形腫を介した分化細胞の誘導法開発: 第 26 回日本サイトメトリー学会, 2016. 07
- ⑦ 梅山 悠伊, 松村 耕治, 市来 やよい, 水野 博司, 宮平 靖. フローサイトメ

トリーを用いたヒト iPS 細胞移植時における奇形腫発症の評価: 第 25 回日本サイトメトリー学会, 2015. 07

- ⑧ 松村 耕治, 石原 美弥, 梅山 悠伊, 市来 やよい, 富澤 正一, 高田 雄三, 新井 仁明, 宮平 靖. ヒト iPS 細胞移植治療のフローサイトメトリーによる奇形腫発症の評価: 第 14 回日本再生医療学会, 横浜市, 2015. 03
- ⑨ 梅山 悠伊, 松村 耕治, 石原 美弥, 市来 やよい, 高田 雄三, 水野 博司, 宮平 靖. 分化誘導ヒト iPS 細胞の薬剤による移植後の奇形腫抑制法の検討: 第 14 回日本再生医療学会, 横浜市, 2015. 03

[図書] (計 1 件)

- ① 松村 耕治 (分担執筆): データ解析と結果の評価, 94-97, 野村昌作、他編, *スタンダードフローサイトメトリー第 2 版*, 日本サイトメトリー技術者認定協議会, 医歯薬出版, 2017.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
松村 耕治 (MATSUMURA Kouji)
防衛医科大学校医学教育部・講師
研究者番号: 30272610

(2) 研究分担者
なし

(3) 連帯研究者
宮平 靖 (MIYAHIRA Yasushi)
防衛医科大学校医学教育部・教授
研究者番号: 40265781

石原 美弥 (ISHIHARA Miya)
防衛医科大学校医学教育部・教授
研究者番号: 30505342

水野 博司 (MIZUNO Hiroshi)
順天堂大学医学部・教授
研究者番号: 80343606

石原 雅之 (ISHIHARA Masayuki)
防衛医学研究センター・教授
研究者番号: 10508500

岡田 義清 (OKADA Yoshikiyo)
防衛医科大学校医学教育部・助教
研究者番号: 90531137

新井 仁明 (ARAI Masaaki)
防衛医科大学校医学教育部・講師
研究者番号：0534864

- (4) 研究協力者
市来やよい
防衛医科大学校医学教育部

梅山悠伊
順天堂大学医学部