

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20580

研究課題名(和文) 無血清培養系での遺伝性顎口腔疾患特異的iPS細胞を用いた発症機構解明と治療応用

研究課題名(英文) Establishment and characterization of oral and maxillofacial disease-specific human iPSCs in serum-, integration- and feeder-free culture

研究代表者

山崎 佐知子 (Yamasaki, Sachiko)

広島大学・病院(歯)・病院助教

研究者番号：00632001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では顎口腔顔面領域に異常をきたす各種遺伝性疾患の発症メカニズムを明らかにし、診断・治療法を開発するため、フィーダーレス無血清培養系にて鎖骨頭蓋異形成症(CCD)、Noonan症候群、Neurofibromatosis type 1、基底細胞母斑症候群、Cowden症候群患者より各種疾患特異的iPS細胞を樹立し特性解析を行うと共に、NGSを用いた網羅的遺伝子解析にて新規変異を報告した。なかでもCCD-およびNoonan-iPS細胞では、軟骨分化誘導時に患者の病態を反映した成熟異常を認めたことから、本疾患特異的iPS細胞を用いて機能解析を行うことで、さらなる病態解明への有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have demonstrated the generation of the disease-specific human iPSCs from oral and maxillofacial disease in completely serum-, feeder-, and integration-free culture. We have successfully generated iPSCs from PBMCs of CCD-iPSCs, Noonan syndrome, Neurofibromatosis type 1, Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome and Cowden syndrome patients in integration-, feeder cell-, and serum-free defined culture. In CCD- and Noonan-iPSCs, there were difference in cartilageous elements between wild type and CCD and Noonan iPSCs in chondrogenesis. This difference observed was similar to those symptoms of these patients. Using these disease-specific iPSCs would provide a powerful platform for examining the pathophysiology of relevant diseases at the cellular and molecular levels and for developing new drugs and therapeutic regimens.

研究分野：口腔外科学

キーワード：細胞培養 再生医療 遺伝子疾患

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト幹細胞 (ES/iPS 細胞) は、フィーダー細胞上で血清添加培地を用いて培養されることが多く、不安定要素や異種抗原、未知の感染性因子の混入等の問題もあるため、細胞増殖・分化制御機構やその制御因子を比較検討することは非常に困難であった。このような培養条件下で培養されたヒト幹細胞では、増殖因子・分化誘導因子の機能を比較することが困難であり、臨床応用の面では安全性が問題となる。そこで、組成の明らかな培養条件の確立および安全性の向上のため、動物由来成分や代替血清などを含まず、全組成が明らかな無血清培地を用いて、ヒト iPS 細胞の樹立し、それら細胞を用いて機能解析を試みた。

また、顎顔面口腔領域に病変を生じる遺伝性疾患においては、その発症メカニズムの解明や診断・治療法が十分に確立されていない。したがって、遺伝性疾患患者由来細胞から無血清培地を用いてフィーダー細胞を使用せず iPS 細胞を樹立・維持し、分化実験を行うことで、詳細な発症メカニズムの解明および診断・治療法の開発を行うとともに、安全な臨床応用の実現を目指して検討を行った。

### 2. 研究の目的

動物由来成分や代替血清などを含まず、全組成が明らかな無血清培養条件を用いて、フィーダー細胞を使用せずヒト iPS 細胞の誘導および維持を試みるとともに、発症メカニズムの解明や診断・治療法が十分に確立されていない顎顔面口腔領域の遺伝性疾患患者よりヒト iPS 細胞を誘導し、同疾患特異的 iPS 細胞を用いてその詳細な発症メカニズムの解明および診断・治療法の開発を行うことを目指した。

### 3. 研究の方法

これまで開発してきたインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養条件にて顎顔面口腔領域の遺伝性疾患特異的ヒト iPS 細胞樹立システムをさらに効率化して、疾患感受性細胞への分化誘導を行い、病態詳細の解明や治療法の開発を行う。また、現在解析中である鎖骨頭蓋異形成症 (CCD)、Noonan 症候群、Cowden 症候群などの疾患特異的 iPS 細胞を用いて変異配列の領域が及ぼす機能的異常に関する解析を行い各種疾患の発症メカニズムの解明ならびに詳細な機能解析を行った。

### 4. 研究成果

～インテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養条件での疾患特異的ヒト iPS 細胞誘導および幹細胞バンク化～

動物由来成分や代替血清などを含まず、全組成が明らかな無血清培地 (hESF9) を基本培地として、フィーダー細胞および血清成分を使用せず、我々の開発した無血清培地

(hESF9) を用いて、ヒト iPS 細胞の未分化性と多分化能を維持可能な無血清培養系を確立し、同培養系を用いて、ゲノム DNA への遺伝子挿入がなく、ウイルスの確実除去が可能なセンダイウイルスベクターを使用し、完全無血清培養系にてヒト iPS 細胞の誘導が可能となった。また同ベクターは初期化 4 遺伝子が同一ベクター上に搭載されているため、誘導効率が安定しており、質の高い iPS 細胞を高効率で誘導可能となった。そこで本培養系を用いて鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) 由来 iPS 細胞を誘導し、樹立維持に成功した (Yamasaki S. et al. In Vitro Dev Biol 2016)。センダイウイルスを使用することで、ゲノム DNA へウイルス由来遺伝子挿入がなく、腫瘍化の原因と成り得ない安全なヒト iPS 細胞の樹立が可能となり、さらに無血清培養系において動物由来蛋白を含まず、感染症等の恐れのない安全で高品質のヒト iPS 細胞の供給が可能となった。

なお、本無血清培養系にて、フィーダー細胞を用いず Noonan 症候群、Cowden 症候群、基底細胞母斑症候群、Neurofibromatosis type 1 (NF1) 等の各患者複数名から疾患特異的ヒト iPS 細胞を誘導することに成功した。これら樹立した細胞は GMP に準拠した細胞培養センター (CPC) と自動細胞凍結保存システムに保存しバンキングを行っている。

～無血清培養系にて樹立した各種疾患特異的 iPS 細胞を用いた特性解析および病態解明、次世代シーケンサーを用いた疾患関連遺伝子解析～

<鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) iPS 細胞を用いた発症メカニズムおよび原因究明>

本疾患の原因遺伝子産物 Runx2 は軟骨細胞分化、破骨細胞分化、歯の発生に重要な因子であるため、樹立した複数例の CCD 患者由来 iPS 細胞を用いて、骨・軟骨細胞系列への分化誘導を行い、健康人由来 iPS 細胞と各種分化マーカー等を用い検討を行った。また、CCD-hiPSC 由来の teratoma では、健康人由来 hiPSC の teratoma と比較し、軟骨基質が少なく、類円形の凝縮した軟骨細胞が観察され、本変異を有する CCD では Runx2 タンパクの機能が障害され、膜性骨化、内軟骨性骨化に障害が生じ、縫合の閉鎖不全や鎖骨の形成異常などを引き起こされたものと考察された。

<Cowden 症候群 iPS 細胞を用いた解析>

Cowden 症候群は原因遺伝子として PTEN 遺伝子に変異を認める遺伝性疾患である。特徴的な皮膚病変を有し、口腔粘膜を含めた全消化管に過誤腫性ポリポージスを生じる。また、多臓器に腫瘍性病変を合併することが多く、癌抑制遺伝子である PTEN が欠損すると PIP3 の産生亢進が進み主に下流の Akt が活性化されることで細胞死抵抗性となり、多くの悪性腫瘍において PTEN の変異が認められている。

Cowden 症候群との臨床診断を得た患者から血球を採取し次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子解析を行い、原因遺伝子 Pten の新規変異を同定した。同細胞を用いた研究から、本変異における Pten 遺伝子発現の低下の原因を明らかとなり、Pten/PTEN ハプロ不全によって本疾患が発症していることが示唆された。フィーダーフリー・インテグレーションフリー・完全無血清培養系を用いた Cowden 症候群由来 iPSC 細胞の研究は、Cowden 症候群の病態のさらなる解明や治療法の開発のみならず、Pten 遺伝子変異に伴う発癌機構の解明や予防に貢献できると考えられた。

<Neurofibromatosis type I (NF1)患者由来 iPSC 細胞を用いた解析>

Neurofibromatosis type I (NF1)、神経線維腫症 型は、神経線維腫とカフェ・オレ斑を主徴候とする疾患である。責任遺伝子が NF1 遺伝子であり、その遺伝子産物ニューロフィブロミン (Neurofibromin: NF)は、健常人では Ras 蛋白の機能を制御して細胞増殖や細胞死を抑制する、癌抑制遺伝子として機能しており、NF1 では NF 蛋白の機能不全が生じるため発症すると考えられているが、その分子機構や発症機構は不明な点が多い。NF1 と臨床診断された 2 名の患者地由来組織より、フィーダー細胞フリー、ウイルスインテグレーションフリーおよび完全無血清培養系で、同症候群特異的 iPSC (NF1-iPSC)を樹立し、その細胞特性を検討するとともに、NGS および ddPCR を用いて詳細な遺伝子解析を行い、その病因の一端を明らかにした。

#### 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 7 件)

1)A Hamada, S Yamasaki, T Okamoto 他 5 名 Generation of Disease-specific human iPSCs in integration-, feeder-, and serum-free culture. Jpn. J. Tissue Cult. Soc. Dent. Res, 査読無 26(1), 29-30, (2017)

2)T Ando, Shrestha, M., S Yamasaki, T Takata 他 5 名 A case of primordial odontogenic tumor: A new entity in the latest WHO classification (2017). Pathol Int, 査読有 67: 365 - 369. doi:10.1111/pin.12543 (2017)

3)H Nakatao, S Yamasaki, T Okamoto 他 3 名. Exploration of Pluripotent Stem Cell (PSC) marker rBC2LCN as the oral squamous cell carcinoma(OSCC) cancer stem cell marker. Jpn. J. Tissue Cult. Soc. Dent. Res, 査読無 26(1), 25-26, (2017)

4)松井健作, 吉岡幸男, 山崎佐知子, 岡本哲治

他 4 名, 異常な口腔内血腫を契機として診断された播種性血管内凝固症候群(DIC)と特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の 2 例, 日口内誌 査読有 (2016)

5)S Yamasaki, A Hamada, T Okamoto 他 5 名. Generation of Cleidocranial dysplasia-specific induced pluripotent stem cells in integration-, feeder-, and serum-free culture. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 査読有 52(2), 252 - 264, (2016) doi:10.1007/s11626-015-9968-x.

6)E Akagi, S Yamasaki, T Okamoto.他 8 名 Generation and maintenance of human induced pluripotent stem cells in serum-free and feeder-free culture condition-comparison of various target cells and virus vectors. Jpn. J. Tissue Cult. Soc. Dent. Res, 査読無 25(1), 21-22, (2016)

7)A Hamada, S Yamasaki, T Okamoto.他 3 名 Generation of Disease-specific human iPSCs in integration-, feeder-, and serum-free culture. Jpn. J. Tissue Cult. Soc. Dent. Res, 査読無 25(1), 23-24, (2016)

[学会発表](計 14 件)

招聘講演

1)S Yamasaki Establishment and characterization of normal and disease-specific human iPSCs in serum-, integration- and feeder-free culture. 2016 world congress on in vitro biology 2016/6/14 San Diego, California

学会発表

2)T. FUKUTANI, A. HAMADA, S. YAMASAKI, T. OKAMOTO 他 5 名 Genetic diagnosis of Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease) and establishment of NF1-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study of disease mechanisms. 7th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry 2018/3/30 International Conference Center Hiroshima

3)福谷多恵子, 山崎佐知子, 岡本哲治他 6 名 Gli1 遺伝子変異を伴う顎関節滑膜性軟骨腫症の 2 例 2017/11/11 第 65 回日本口腔科学会中国四国地方部会 高知

4)福谷多恵子, 山崎佐知子, 岡本哲治他 6 名 Neurofibromatosis type I の遺伝子診断及び同疾患特異的 induced pluripotent stem cells (iPSC)のインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での樹

立による疾患研究 2017/11/4 第 54 回 口腔  
組織培養学会 盛岡

5)F Obayashi, A Hamada, S Yamasaki, T Okamoto 他 5 名 Genetic diagnosis of Cowden Syndrome (CS) and establishment of CS-specific induced pluripotent stem cells (iPSC) in virus integration-, feeder-, and serum-free defined culture for disease model study 2017/10/9 the 15th international conference on cellual endocrinology. Hiroshima city

6) 福谷多恵子, 山崎佐知子 他 4 名 Neurofibromatosis type I の遺伝子診断及び同疾患特異的 induced pluripotent stem cells (iPSC)のインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での樹立研究 2017/9/5 第 27 回日本口腔内科学会、第 29 回日本口腔診断学会 札幌

7)H Nakatao, S Yamasaki, T Okamoto 他 3 名. Function of rbc2lcn Lectin-recognizing Glycoprotein-positive Cells in Squamous Cell Carcinoma Cell Lines 2017/6/12, 2017 In Vitro Biology Meeting, Raleigh, North Carolina

8)濱田充子, 山崎佐知子, 岡本哲治他 5 名. 完全無血清・フィーダーフリー・ウイルスインテグレーションフリー培養系での疾患特異的 iPS 細胞 (iPSC) の樹立と病態モデル研究 2017/4/25 第 71 回日本口腔科学会学術集会, 愛媛

9)中峠洋隆, 山崎佐知子, 赤木恵理, 濱田充子, 虎谷茂昭, 岡本哲治 扁平上皮がん細胞株における rBC2LCN レクチン認識糖鎖発現細胞の機能 2017/4/25 第 71 回日本口腔科学会学術集会, 愛媛

10)大林史誠, 濱田充子, 中峠洋隆, 山崎佐知子, 岡本哲治. Cowden 症候群特異的 iPS 細胞の樹立研究 2017/4/25 第 71 回日本口腔科学会学術集会, 愛媛

11) Akagi, S Yamasaki, 他 8 名 Generation of human iPS cells in serum-free and feeder-free defined medium -Comparison of the host cell and virus vectors-. The 70th annual meeting of the Japanese Stomatological Society, Fukuoka, 2016/4/17

12)H Nakatao, S Yamasaki, 他 4 名 Exploration of Pluripotent Stem Cell (PSC) marker rBC2LCN as the oral squamous cell carcinoma (OSCC) cancer stem cell marker. The 70th annual meeting of the Japanese Stomatological Society, Fukuoka, 2016 /4/16

13)F Obayashi, S Yamasaki, T Okamoto. 他 6 名 Gene diagnosis of Cowden syndrome and generation of disease-specific iPSCs. The 70th annual meeting of the Japanese Stomatological Society, Fukuoka, 2016 /4/17

14)A Hamada, S Yamasaki, T Okamoto. 他 5 名 Study on disease-specific iPSC generation to create disease models. The 70th annual meeting of the Japanese Stomatological Society, Fukuoka, 2016 /4/17

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 佐知子 (YAMASAKI Sachiko)  
広島大学, 病院 (歯) 病院助教  
研究者番号 : 00632001

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

( )