

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20624

研究課題名(和文)凍結切片を利用したiPS細胞の分化誘導メカニズムの解明と品質評価法としての有用性

研究課題名(英文) Analysis of differentiation-inducing factors on the induction method for iPS cells using frozen sections.

研究代表者

田所 晋 (Susumu, Tadokoro)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：70552412

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)：凍結切片を利用したiPS細胞の分化誘導法のメカニズムの解明および本分化誘導法を応用した新たな品質評価法の実用化を目指して以下の研究を行った。これまでにわれわれが報告してきた凍結切片上培養法の分化誘導メカニズムにつきタンパク質性液性因子とmicroRNAの観点から分子細胞生物学的に検討をした。また、これらの因子がどの程度の割合で分化誘導に働いているのかを明らかにし、分化誘導効率の向上と品質評価の性能向上を目指すした。その結果、凍結切片から得られるタンパク質性液性因子が有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We clearly demonstrated that iPSCs are capable of differentiating into a specific cell lineage in response to certain factors contained in frozen sections of tissues/organs. Interestingly, the differentiation efficiency of iPSCs on the frozen sections was clearly different among iPSC clones. Judging from these facts, this induction method of human iPSCs using frozen sections is considered to be useful as a simple and effective means for inducing the differentiation of iPSCs and also for evaluating the potential and/or quality of iPSCs. Our results also suggest that some factors, such as proteins and microRNA that can be inactivated/eliminated by fixation, may contribute to the induced differentiation of iPSCs on frozen sections. The cellular and molecular biological mechanisms underlying this phenomenon could be clearly elucidated in the near future.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医学 iPS細胞 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

種々の疾患や外傷により本来の機能や形態が失われた組織や臓器に対して、現在行われている生体臓器移植や人工臓器移植などの先端医療には、それぞれ拒絶反応や、耐久性・機械的強度などの様々な問題点や限界がある。このことから近年、様々な細胞源を用いた再生医療の果たす役割は大きくなってきており、なかでもiPS細胞を利用した再生医学は最も臨床応用が期待されている研究分野の一つである。しかし、iPS細胞を再生医療に応用するには解決すべき問題があり、これらはiPS細胞の特異的性質に起因している。iPS細胞を臨床応用するには、安全・確実・簡便・安価な分化誘導法の確立、iPS細胞の品質評価法の確立、および目的とする機能細胞への分化に適したiPS細胞クローンの選別法の確立が重要であると考えられる。現在報告されている分化誘導法は種々の増殖・分化因子を組み合わせるものであるが、添加因子の理想的組合せの決定はきわめて困難で、また経済的・時間的負担が大きい。さらに、iPS細胞は作製した株すべての品質が同一ではなく、由来細胞の遺伝的背景や作成方法、培養条件によりその性質に差があること、同じ組織より採取した細胞から作製したiPS細胞でも分化能に差があること、シングルコロニーから分離したiPS細胞でも増殖の過程で各クローン間に分化誘導に対する反応に差が生じることなどが明らかになってきているが、未だこれを評価しよりよい株を選択する方法は確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでに、これらの課題を克服することを目的に、分化誘導環境を実際に再生を目指す組織・臓器自体に求めることで分化誘導が可能ではないかという仮説の下、目的臓器の凍結切片上でiPS細胞を培養し分化を誘導するという、簡便で安価なまったく新しい方法を試みてきた。その結果、肝臓凍結切片上で培養したiPS細胞で、肝細胞への分化が高率に誘導されることを見出した。また、脳および脊髄凍結切片上で培養したiPS細胞では、神経系細胞への分化が高率に誘導されることを見出した。これは異なる体細胞由来のiPS細胞や異なる樹立方法のiPS細胞4株でも同様の結果が得られ、本誘導法が普遍的に様々な由来のiPS細胞の分化誘導に応用できる可能性が強く示唆された。本法は従来の分化誘導法と比較し、各種増殖・分化因子を添加する培養に依存しない新たな視点に立った簡便な分化誘導法の確立に成功したものである。一方で、異なる体細胞由来のiPS細胞や異なる樹立方法のiPS細胞4株

をそれぞれ比較すると、本誘導法による分化誘導に対する反応効率に差を認め、本誘導法が分化能の差を評価できる可能性が示唆された。この研究成果から本誘導法がiPS細胞の新たな分化誘導法として、また、品質評価法として有用であることが強く示唆されたと考えている。そこで、本研究では、本誘導法の実用化を目指すにあたり、本法における、培養上清中の各種因子の解析や、細胞の接着する足場としての微小環境などの分化誘導環境、さらには凍結組織切片が放出するmicroRNAなどに着目することにより、分化誘導環境の詳細な解析を行い、本法の分化誘導現象のメカニズムを解明することで、本法のみでなく現在報告されている分化誘導法をより効率的で確実な誘導法にすることを旨とする。本法による分化誘導刺激に対する反応性の差に基づいたiPS細胞クローンの選別および品質評価の判断が正しいかどうかについて検討し、本法の実用化が可能かどうかについて検討する。

3. 研究の方法

凍結切片上培養におけるiPS細胞の分化誘導メカニズムを解明することを目指して、(1)液性タンパク質因子(増殖・分化因子)、(2)細胞外基質(組織の微細構造を含む)および(3)microRNAの3つの観点から検討を行う。

(1)液性タンパク質因子を対象とした研究計画

マウスから肝臓、脳、脊髄を摘出し、それぞれカバーガラス上に凍結切片を作製する。これを同径のガラスボトムディッシュ内に静置する。この際、凍結切片を4%パラホルムアルデヒドまたは冷アセトンにて固定することで、液性タンパク質因子を固定し、その作用を阻害し、分化誘導を行う。4%パラホルムアルデヒド固定の場合は固定した後、残存するアルデヒドをグリシンにて不活化する。その切片上にiPS細胞を播種し、培養することで分化誘導を行う。分化誘導後、用いた各組織・臓器の機能細胞に特異的な分子(例えば肝臓では肝細胞に対してAFP、AAT、脳・脊髄では各種神経系細胞に対してGFAP、CNPaseなど)の発現を免疫細胞化学的手法を用いて解析し、未固定凍結切片と固定凍結切片の両者における陽性細胞率(すなわち分化誘導効率)を比較検討することにより、本法における分化誘導が液性タンパク質因子によるものか否かが明らかにする。

(2)細胞外基質(組織微細構造)を対象とした研究計画

前項の場合と同様に各種組織・臓器の固定凍結切片を作製し、低濃度トリプシン、

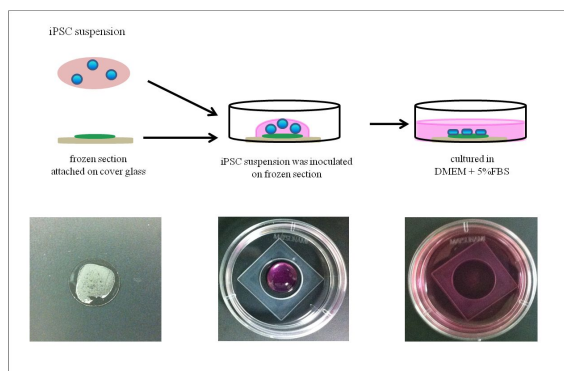
ディスペラーゼおよびコンドロイチナーゼABCで1~10分間処理し、凍結切片中に存在する各種細胞外基質組成およびその微細構造を変化させる。このようにして作製した固定凍結切片上にiPS細胞を播種し前項と同様の方法で分化誘導効率およびSEM（走査型電子顕微鏡）による表面構造変化との関係性につき検討を加え、主に細胞外基質の微細構造がiPS細胞の分化に及ぼす影響につき明らかにする。

(3)microRNAを対象とした研究計画

幹細胞の自己複製能や分化能をコントロールしているとされるmiRNA (microRNA) に着目し、各種組織・臓器の凍結切片よりmiRNAを抽出し、これを培養液中に添加して通常に従ってiPS細胞の培養を行い、分化誘導効率精査し、凍結切片上培養の場合の誘導効率と比較することで、miRNAの分化誘導への関与の有無、重要度につき検討を加える。また、miRNAが本法によるiPS細胞の分化誘導に何らかの役割を演じている可能性が確認された際には、次世代高速シーケンサーあるいはLNA(locked nucleic acid)やメチル化核酸などの修飾期を持ったプローブなどを利用したmicroRNAアレイにより網羅的解析を行い、どのようなmiRNAが分化誘導に働いているのかについて明らかにする。これまでに幹細胞で発現が低く、分化誘導によって増加することが知られているmiRNAであるlet-7ファミリーやmiR-21, 22, 145などについてとくに詳細に検討するとともに新規miRNAの関与についても併せて検討する。

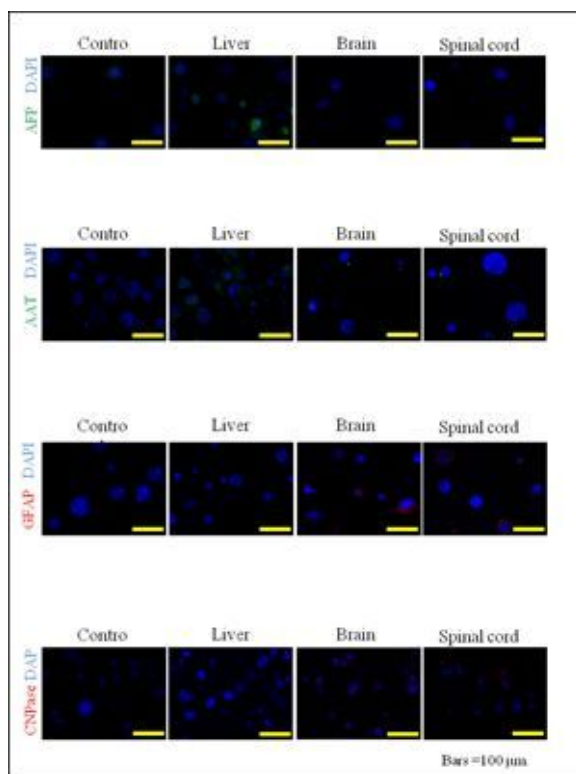
4. 研究成果

液性タンパク質因子の影響を検討した。マウスの肝臓、脳、脊髄を摘出し凍結切片を作製し、凍結切片より得られる液性タンパク質因子の影響を除外するため、凍結切片を4%PFAまたは冷アセトンにて固定した。この切片上にiPS細胞を播種し、8日間培養を行った。

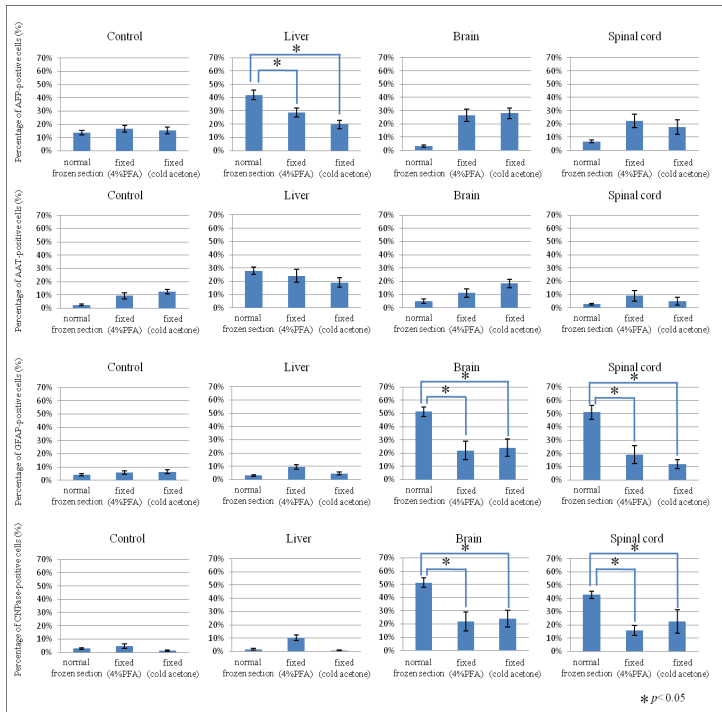


8日間培養後にiPS細胞のタンパク質発現を免疫細胞化学的手法に評価した。肝細胞マーカーとしてAFP, AATを、神経系細胞マーカーとしてGFAP, CNPaseの発現を評価した。

その結果、コントロール群（カバーガラス上にiPS細胞を播種した群）では肝細胞、神経系細胞マーカーともに陽性細胞が少ないのに対し、肝臓群（肝臓の凍結切片上で培養した群）では、肝細胞マーカーの陽性細胞が多く、また脳群（脳の凍結切片上で培養した群）、脊髄群（脊髄の凍結切片上で培養した群）では神経系細胞マーカーの陽性細胞が多く認められた。そこで、それぞれの全有核細胞数に対する陽性細胞数を測定することにより、分化誘導効率の差を評価した。



その結果、AFP陽性細胞率はコントロール群と比較して肝臓群が高率で、さらに肝臓群の中でも4%PFAまたは冷アセトンにて固定した二つの群は、固定処理をしていない通常の凍結切片群と比較して陽性細胞率が有意に低かった。また、GFAP, CNPase陽性細胞率はコントロール群、肝臓群と比較して脳群、脊髄群が高率で、さらに脳群、脊髄群の中でも肝臓群と同様に4%PFAまたは冷アセトンにて固定した二つの群は、固定処理をしていない通常の凍結切片群と比較して陽性細胞率が有意に低かった。これらの結果から、凍結切片は4%PFAまたは冷アセトン固定処理を行っても、分化誘導能が有すること、しかし一方で固定処理により分化誘導能が低下することが示された。



よって、本誘導法のメカニズムとして固定処理により失われた液性タンパク質因子が分化誘導能を有することが示唆された。さらに、液性タンパク質因子以外の因子が分化誘導に働いていることも示唆され、今後細胞外基質やmicroRNAについても検討をしていく予定である。

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 2件)

1. 田所晋、徳山麗子、舘原誠晃、井出信次、梅木泰親、里村一人 凍結切片を用いたiPS細胞の新規分化誘導法の確立と品質評価法への応用 第23回日本歯科医学会総会 2016年10月21 - 23日

2. 田所晋、徳山麗子、舘原誠晃、井出信次、里村一人 凍結切片を利用したiPS細胞の分化誘導法における誘導因子の解析 第61回口腔外科学術総会・学術大会 2016年11月25 - 27日

6. 研究組織

(1)研究代表者

田所 晋 (TADOKORO, Susumu)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：70552412