

令和元年6月14日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17252

研究課題名(和文) ゴーリン症候群特異的 iPSC の樹立とゲノム手術による嚢胞性歯原性腫瘍発生機構解明

研究課題名(英文) Establishment of Gorin syndrome specific iPSC and elucidation of the mechanism of cystic odontogenic tumor by genome operation

研究代表者

濱田 充子 (Hamada, Atsuko)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：30760318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、顎顔面口腔領域に病変を生じる遺伝性疾患の発症機構の解明や診断・治療法の確立を目指して、基底細胞母斑症候群(NBCCS)をモデルに、NBCCS由来 iPSC を無血清・無フィーダー培養条件で誘導・樹立した。さらに、無血清条件での病態モデルを作成するため、健常人 iPSC および NBCCS-iPSC を用いて上皮系幹細胞・間葉系幹細胞の分化誘導実験を行い、比較検討を行った。その結果、誘導した上皮系幹細胞の増殖能において、NBCCS-iPSC 由来の方が健常人のそれと比較し高いことから、病態の一部を *in vitro* で再現できた可能性を示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎顔面口腔領域に病変を生じる遺伝性疾患においては、その発症機構や診断・治療法が十分に確立されていない。本研究では基底細胞母斑症候群(NBCCS)をモデルとして NBCCS 疾患特異的 iPSC の樹立に成功した。さらに、本疾患の主要な症状である顎骨多発嚢胞の発症機序を明らかにする目的で、NBCCS-iPSC を上皮細胞に分化誘導し健常人 iPSC 由来のそれと比較することで、NBCCS-iPSC 由来上皮細胞は増殖能が高いことを明らかとした。本研究より得られる知見は、顎顔面口腔疾患の病態解明や発症機序の解析、さらには治療法の開発研究に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the onset mechanism of hereditary diseases causing lesions in the maxillofacial region and establish a diagnosis and treatment method, and successfully induced and established NBCCS disease specific iPSCs under serum- and feeder-free culture conditions. Furthermore, to create a pathological condition model under serum-free conditions, we performed inductions of epithelial stem cells and mesenchymal stem cells using wild type iPSCs and NBCCS-iPSCs, and compared. As a result, in the proliferation ability of the induced epithelial stem cells, the NBCCS-iPSC-derived one is higher than that of the wild type-iPSC-derived one, which indicates that a part of the pathological condition could be reproduced *in vitro*.

研究分野：口腔外科

キーワード：疾患特異的 iPSC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域に異常を生じる遺伝性疾患においては、その表現型の多様性と発生の複雑性から、発症機構について明らかにされておらず、診断・治療法は十分に確立されていない。基底細胞母斑症候群(ゴーリン症候群、NBCCS)は、PTCH1 遺伝子のハプロ不全により外胚葉・中胚葉に腫瘍並びに奇形を多発する常染色体優性遺伝の疾患で、手掌・足底皮膚小陥凹、二分肋骨、大脳鎌石灰化などの発達上の奇形や、加齢と共に発症する顎骨嚢胞、基底細胞癌、髄芽腫、卵巣腫瘍なども報告されている。PTCH1 は癌抑制遺伝子としての働きもあり、加齢・放射線等による組織の Loss of heterozygosity により癌が発生すると考えられている。また、本疾患で認める顎骨嚢胞は、嚢胞上皮が錯角化を示すもので、ゴーリン症候群に伴って多発性に生じるものがあること、皮質骨を破壊し周囲組織に及ぶことがあること、基底細胞層直上の細胞増殖活性が高いことから角化嚢胞性歯原性腫瘍 (KCOT) という良性腫瘍の一つとして扱われている。KCOT は健常人においても高い発症率を示し、本病変の発症に PTCH1 の関与が認められている。また、その由来は歯牙硬組織形成開始前のエナメル器とも考えられているが詳細は明らかでない。

一方で研究者代表の所属する研究室では、iPSC 誘導・培養法に関わる様々なリスクを排除すべく、インテグレーションフリー、フィーダーフリー、無血清培養条件での iPSC 誘導・培養法を確立し、種々の遺伝性顎顔面疾患患者細胞から疾患特異的 iPSC を樹立することに成功している(図 1)。これらの成果に基づき、本研究ではゴーリン症候群特異的 iPSC (NBCCS-iPSC) を誘導し病態解明を目指した。

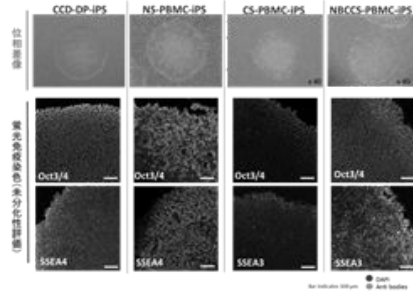


図 1. 当科で樹立した各種疾患特異的 iPSC 細胞

2. 研究の目的

顎顔面領域に異常を生じる遺伝性疾患においては、その表現型の多様性と発生の複雑性から、発症機構について明らかにされておらず、診断・治療法は十分に確立されていない。本研究では、NBCCS をモデルに、その診断・治療法の開発を目指して、NBCCS 由来 iPSC を当科で開発したインテグレーションフリー、フィーダーフリー、無血清培養条件で誘導・樹立し、その細胞特性解析及び病原モデルを作成するとともに、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて NBCCS-iPSC の病原変異遺伝子の“ゲノム手術”を行い、遺伝性顎顔面疾患の病態解明、診断・治療法の開発に挑む。

3. 研究の方法

(1) NBCCS-iPSC の樹立

孤発性のそれぞれ異なった変異(1:PTCH1 c.1539T>G, 2: PTCH1 c.2733_2734 ins.TG)を有する 2 名の NBCCS 患者より末梢血を採取、末梢血単核球を分離培養し、本研究室で開発された hESF9 培地(Proc Natl Acad Sci U S A. 2008,105(36):13409-14)および山中四因子を搭載したセンダイウイルスベクターを用いて、無血清条件下に NBCCS1-iPSC および NBCCS2-iPSC 誘導・維持を行った。

(2) NBCCS-iPSC のゲノム手術

2 種類の変異に対応するそれぞれの gRNA、CRISPR/Cas9、ドナーベクター(GFP、puromycin 耐性遺伝子搭載)の導入を、エレクトロポレーション法およびリポフェクション法で検討した。

(3) NBCCS-iPSC を用いた完全無血清条件下での分化誘導実験

A. 上皮系細胞への分化誘導実験

基礎培地として無血清培地 hESF9 から FGF-2 およびヘパリンを除いた hESF7 培地を用いて、epidermal growth factor (EGF)、FGF-2、TGF- β 1、BMP2、BMP4、activinA、sonic hedgehog (SHH)、Wnt あるいはレチノイン酸の分化に及ぼす影響を検討し、定量 PCR 及び蛍光細胞免疫で TP63、KRT5、MAP2 の発現の評価を行った。

B. 間葉系細胞への分化誘導実験

hESF7 培地および 96well 低吸着プレートを用いて胚様体(EB)を作成(1 x 10⁵ 細胞/EB)し、それらの EB をゼラチンコートした dish に播種、それらを hESF9 培地で数継代することで間葉系細胞を誘導する。CD73/90/105 の蛋白発現を FACS (sony cell sorter) にて検討した。

C. 三次元培養システムの構築

A 及び B で誘導した各細胞を Type1 コラーゲンを用いてそれぞれもしくは組み合わせて三次元培養を行った。

4. 研究成果

(1) NBCCS-iPSC の樹立

初期化された細胞はES細胞様であり、それらを機械的にpick upし継代・維持を行い、未分化性の評価を行うとともに、胚様体を介した分化誘導実験およびマウスを用いた奇形腫形成試験において多分化能の評価をおこなった。その結果、NBCCS1-iPSC および NBCCS2-iPSC はそれぞれ未分化マーカーである Oct3/4、Nanog、SSEA3、SSEA4、Tra-1-60 の蛋白発現を認めること、in vitro および in vivo で三胚葉に分化することが示された(図2)。また、NBCCS1-iPSC および NBCCS2-iPSC はそれぞれの NBCCS 患者に由来する変異を維持していることが明らかとなった。

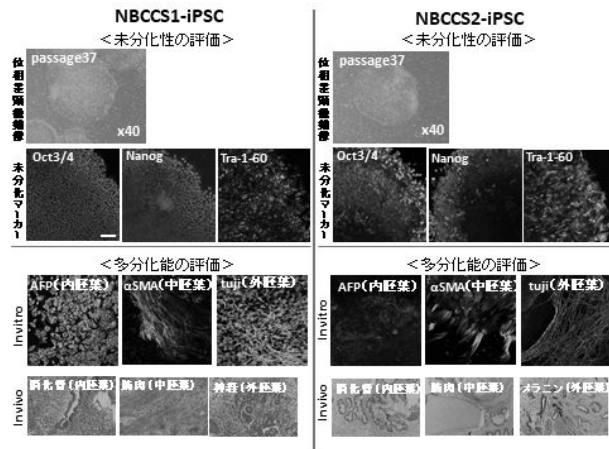


図2. 樹立したNBCCS-iPSCの未分化性と多分化能の評価

(2) NBCCS-iPSC のゲノム手術

ドナーベクターの導入をエレクトロポレーション法およびリポフェクション法で検討し、GFP導入効率で評価したが、導入処理後72時間でGFP陽性の細胞が1割以下であり(図3)ゲノム手術は成功しなかった。

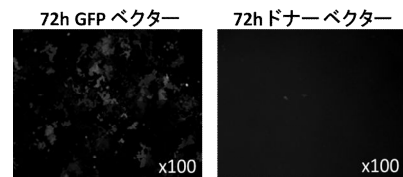


図3. GFPベクターとドナーベクター間のGFP陽性細胞の比較

(3) NBCCS-iPSC を用いた完全無血清条件下での分化誘導実験

A. 上皮系細胞への分化誘導実験

epidermal growth factor (EGF)、FGF-2、TGF-β1、BMP2、BMP4、activin A、sonic hedgehog (SHH)、Wnt 及びレチノイン酸 (RA) を様々な組み合わせで hESF7 培地に添加し、細胞濃度 1×10^5 でラミニンコートした 24well プレートに播種。分化誘導後 6 日目に

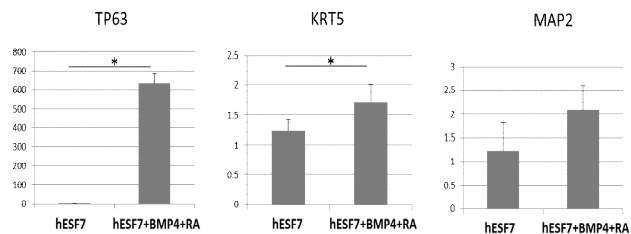


図4. RA と BMP4 を添加後の遺伝子発現の変化

RNA を採取し定量 PCR を行った。その結果、特に RA (1 μM) と BMP4 (10ng/ml) の組み合わせで神経マーカーの一つである MAP2 は上昇せず、上皮系マーカーである KRT5

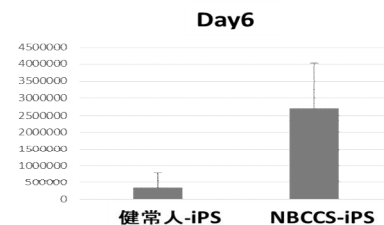


図5. 上皮細胞への分化誘導後の増殖能の健康人との比較

と TP63 の有意な上昇を認めた(図4)。同方法で健康人 iPSC と NBCCS-iPSC を用いて上皮分化誘導後の増殖能を比較検討したところ、NBCCS-iPSC の方がその増殖能が高いことが示された。(図5)

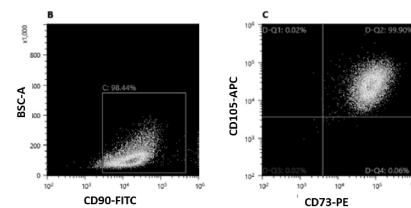


図6. FACS解析(左図: CD90陽性細胞をゲーティングした図、右図: 左図でゲーティングされた細胞群をさらにCD73(横軸)とCD105(縦軸)で識別)

B. 間葉系細胞への分化誘導実験

健康人 iPSC と NBCCS-iPSC を用いて完全無血清条件下に、間葉系幹細胞を分化誘導し、FACSにてCD73/90/105陽性細胞の割合を検討した。その結果、いずれの iPSC 細胞より誘導された間葉系幹細胞においても、その約

75-95%が CD73/90/105 陽性であることが示された(図6)。

C. 三次元培養システムの構築

健康人 iPSC 及び NBCCS-iPSC それぞれより、完全無血清培養系で誘導した上皮細胞及び間葉系幹細胞を、単独あるいは混合し Type コラーゲン内で無血清培養条件下に三次元培養を行った。その結果、間葉系幹細胞の単独培養は困難であったが、上皮細胞を含む培養であれば間葉系幹細胞の含不含有にかかわらず、三次元培養可能であった。しかしながら、上皮単独あるいは共培養開始2週間後の組織切片的HE染色像において、健康人とNBCCS由来の組織はいずれもシート状に単層の基底層様の構造を形成し、健康人

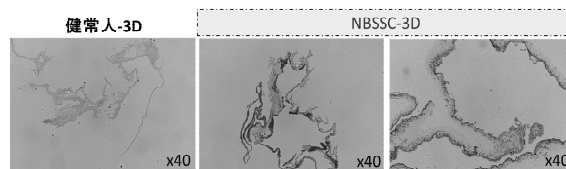


図7. 上皮細胞三次元培養2週間後の組織HE染色像(x40)

と NBCCS の間で明らかな差は認めなかった (図 7)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 中瀬洋司/ 濱田充子/ 中峠洋隆/ 大林史誠/ 山崎佐知子/ 畑毅/ 北村直也/ 山本哲也/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 疾患特異的 induced pluripotent stem cell (DS-iPSC)の樹立と疾患研究:口腔組織培養学会誌 査読無 28 巻 1 号 P23-24 2019.
2. 濱田充子/ Nguyen Quang Tam / 内迫香織/ 中瀬洋司/ 中峠洋隆/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 無血清培養系を用いた扁平上皮癌細胞株からの放射線耐性細胞の樹立とその機能解析:口腔組織培養学会誌 査読無 28 巻 1 号 P33-34 2019.
3. 佐藤成紀/ 濱田充子/ 櫻井繁 / 浜名智昭/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 口腔原発神経内分泌癌由来細胞株の樹立-初代培養腫瘍細胞の増殖様態から診断されるに至った口腔原発神経内分泌癌-:口腔組織培養学会誌 査読無 28 巻 1 号 P9-10 2019.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. A. Hamada, Y. Nakase, F. Obayashi, T. Fukutani, H. Nakatao, E. Sakaue, S. Yamasaki, T. Kanda, K. Koizumi, Y. Yoshioka, R. Tani, S. Toratani, JD. Sato, T. Okamoto: Establishment and Characterization of Disease-specific Human iPSCs in Serum-, Integration- and Feeder-free Cultures: 2019 In Vitro Biology Meeting (Tampa, USA), 2019.6.14.
2. 中瀬洋司/ 濱田充子/ 中峠洋隆/ 大林史誠/ 山崎佐知子/ 畑毅/ 北村直也/ 山本哲也/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 基底細胞母斑症候群 (NBCCS)の遺伝子解析及び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 NBCCS 特異的 induced pluripotent stem cells (iPSCs)の樹立研究: 第 73 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (埼玉), 2019.4.20.
3. 濱田充子/ 佐藤成紀/ 内迫香織/ 中瀬洋司/ 大林史誠/ 中峠洋隆/ 山崎佐知子/ 谷亮治/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 無血清培養系での口腔癌由来細胞株の樹立: 第 73 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (埼玉), 2019.4.20.
4. 佐藤成紀/ 濱田充子/ 櫻井繁/ 浜名智昭/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 口腔原発神経内分泌癌由来細胞株の無血清培養系での樹立: 第 73 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (埼玉), 2019.4.20.
5. 内迫香織/ 濱田充子/ 三島健史/ 松井健作/ 谷亮治/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 無血清培養系を用いた扁平上皮癌細胞の放射線耐性獲得機構の細胞内分泌学的機能解析: 第 73 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (埼玉), 2019.4.20.
6. 濱田充子/ イエン クワン タム/ 内迫香織/ 中瀬洋司/ 中峠洋隆/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 無血清培養系を用いた扁平上皮癌細胞株からの放射線耐性細胞の樹立とその機能解析: 第 55 回口腔組織培養学会 (兵庫), 2018.11.10.
7. 中瀬洋司/ 濱田充子/ 中峠洋隆/ 大林史誠/ 山崎佐知子/ 畑毅/ 北村直也/ 山本哲也/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 疾患特異的 induced pluripotent stem cell (DS-iPSC)の樹立と疾患研究: 第 55 回口腔組織培養学会 (兵庫), 2018.11.10.
8. 佐藤成紀/ 濱田充子/ 櫻井繁/ 浜名智昭/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 口腔原発神経内分泌癌由来細胞株の樹立-初代培養腫瘍細胞の増殖様態から診断されるに至った口腔原発神経内分泌癌-: 第 55 回口腔組織培養学会 (兵庫), 2018.11.10.
9. 濱田充子/ 中瀬洋司/ 中峠洋隆/ 大林史誠/ 福谷多恵子/ 山崎佐知子/ 神田拓/ 小泉浩一/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 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 iPSC 細胞 (iPSC)の樹立と病態モデル研究 第二報: 第 72 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (愛知), 2018.5.12.
上記学会にて日本口腔科学会学会賞優秀ポスター賞受賞
10. 福谷多恵子/ 濱田充子/ 中峠洋隆/ 大林史誠/ 山崎佐知子/ 神田拓/ 小泉浩一/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: レックリングハウゼン病由来 iPSC 細胞のインテグレーションフリー・フィーダーフリー・無血清培養系での樹立による疾患研究: 第 72 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (愛知), 2018.5.12.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等:なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。