

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17210

研究課題名(和文)凍結切片を用いたiPS細胞の分化誘導法による品質評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new method for differentiation induction of iPS cells using frozen sections.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：分化誘導環境を再生を目指す組織・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細胞を培養し分化誘導をこころみた。iPS細胞を肝臓、脳、脊髄の凍結切片上で9日間培養した。肝臓の切片上で培養されたiPS細胞は肝細胞様形態を呈したのに対し、脳と脊髄の切片上で培養したのは神経細胞様形態を呈した。肝臓の切片上で培養したiPS細胞の肝細胞マーカー陽性細胞率は脳や脊髄のと比較して高かった。これに対し、脳と脊髄の切片上で培養したiPS細胞は神経細胞マーカー陽性細胞率が高かった。

このことより、凍結切片中のなんらかの因子がiPS細胞を分化誘導できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在報告されている分化誘導法は、分化誘導因子を各種組合せにより添加していく方法がほとんどである。しかし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本誘導法はまったく新しい独創的な分化誘導法でありこれまでの誘導法と比較し簡便で安価な方法である。

また本研究で行う誘導法のメカニズムの解明は、本法のみでなく従来の分化誘導法をより効率的で確実な分化誘導法とするとともにiPS細胞の分化誘導刺激に対する反応性の差を評価する簡便なiPS細胞の品質評価法の確立に寄与し、iPS細胞の臨床応用へ大きく貢献する有意義な研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Considering that every tissue/organ has the most suitable microenvironment for its functional cells, controlling induced pluripotent stem cell (iPSC) differentiation by culture on frozen sections having a suitable microenvironment is possible. iPSCs were cultured on the frozen sections of the liver, brain, spinal cord for nine days. iPSCs cultured on the sections of the liver resembled hepatocytes, whereas those on sections of the brain and spinal cord resembled neuronal cells. The percentage of hepatocytic marker-positive cells in iPSCs cultured on the sections of the liver was statistically higher than that of those in iPSCs cultured on the sections of the brain and spinal cord. In contrast, iPSCs cultured on the sections of the brain and spinal cord revealed a high percentage of neural marker-positive cells. Thus, iPSCs can be differentiated into a specific cell lineage in response to specific factors within the frozen sections of the tissues/organs.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 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製方法、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。

そこで研究代表者はこれまでに、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。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、これまでに本誘導法により分化誘導に成功している肝細胞、神経系細胞以外の細胞を分化誘導することにより、本法の普遍性を証明し実用化を目指すことを目的とする。さらにこのときの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、本法における分化誘導環境の詳細な解析を行い、そ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様々な分化誘導法をより効率的で確実な誘導法とする一助となることを目指すとともに、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、本法の実用化を目指し、今後の再生医療の発展に寄与することを目指すものである。

## 2. 研究の目的

再生医療において iPS 細胞は最も注目される細胞の一つであり、iPS 細胞を応用した再生医療の実現に対する国民の期待は大きい。しかし、iPS 細胞を臨床に応用するためにはいくつかの克服すべき課題がある。現在、iPS 細胞の効率的かつ確実な分化誘導法は確立しておらず、また iPS 細胞の品質評価法も確立されていない。私は、これまでに肝臓及び脳・脊髄組織の凍結切片上で iPS 細胞を分化誘導するという、従来の分化誘導法と比較し各種増殖・分化因子によらない全く新たな観点に立脚した分化誘導法を確立してきた。さらにこの過程で各種 iPS 細胞の誘導に対する反応性の差から品質評価法としても有用であることが証明された。本研究ではこの分化誘導法を他の組織の凍結切片を用いて応用し、iPS 細胞分化誘導することが可能か否か、また反応性の差による簡便な品質評価法として有用な否か、つまり本法が普遍的に応用可能かにつき検討する。

## 3. 研究の方法

凍結切片を利用した iPS 細胞の分化誘導が普遍的に様々な種の細胞の分化誘導に応用できるか否かを検討し、さらにそのメカニズムを解明することで iPS 細胞品質評価法としての本法の有用性につき検討する。マウスの肝臓、脳、脊髄、心臓、腎臓、膵臓、唾液腺から凍結切片を作製し、その切片上で iPS 細胞を培養することで、それぞれの組織の細胞へと分化誘導することが可能か否かについて検討する。さらに由来の異なる数種の iPS 細胞を用いて同様に分化誘導が可能か否かについて検討し、普遍性を確認する。また、このときのそれぞれの iPS 細胞での誘導効率の差について検討し、品質評価法として有用か否かを検討する。加えてこれらの誘導時のメカニズムについて詳細に検討し、分化誘導に有効な因子について探索するとともに、

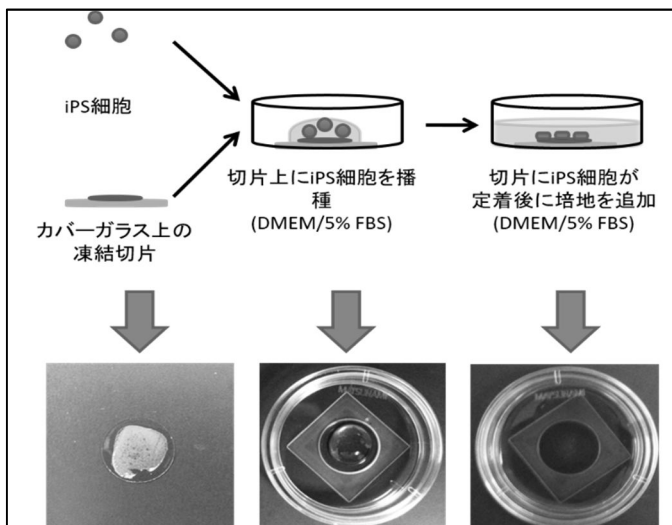
その因子本法の分化誘導時に添加することでより高率な分化誘導が可能か否かについて検討し、新たな iPS 細胞の分化誘導法と品質評価法の普遍性の確認を通して、本法の実用化を目指す。具体的には以下のように検討を進める。

## 4. 研究成果

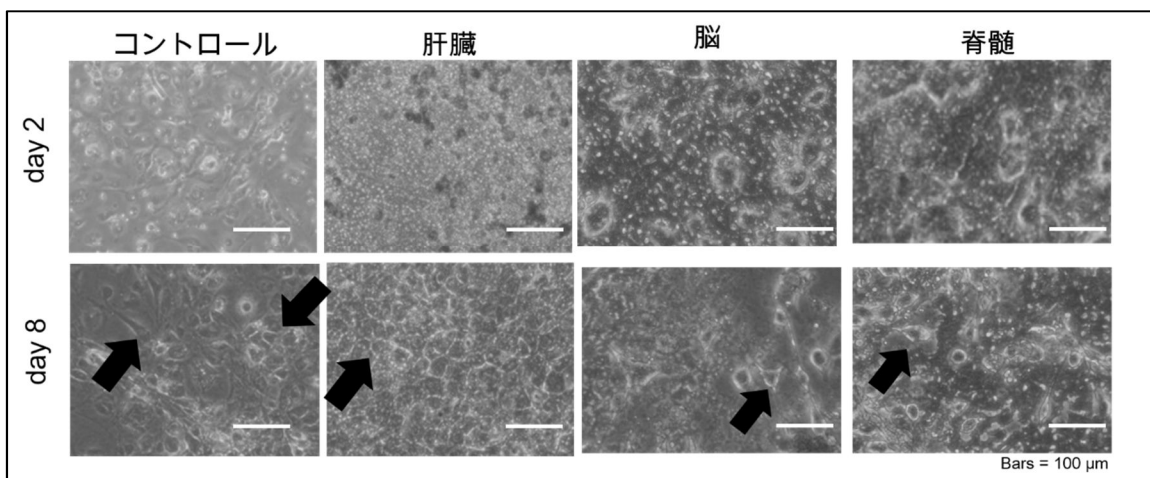
マウスの肝臓、脳、脊髄、心臓、膵臓、脾臓、腎臓、唾液腺を摘出し凍結切片を作製し、この

切片上に iPS 細胞を播種し、9 日間培養を行った。

培養期間中に iPS 細胞の形態の変化を位相差顕微鏡にて観察した。コントロール（カバーガラスに直接 iPS 細胞を播種したもの）肝臓いずれにおいても iPS 細胞のコロニーが拡がり細胞がばらけていくのが認められ、脳、脊髄、心臓、膵臓、脾臓、腎臓、唾液腺では切片上への細胞の広がりには認められなかった。また細胞形態の変化も認められ、コントロール群では拡がった 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肝細胞様形態を呈する傾向が認められた。さらに脳



群、脊髄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られた。心臓、腎臓ではコントロールと同様の形態を呈する細胞が多く、膵臓、脾臓、唾液腺では切片上に定着する細胞が少なく形態の変化もコントロール群と同様で明らかな統一性が認められなかった。



9 日間の培養後にそれぞれの細胞を回収し、qPCR 法にてそれぞれの細胞に特異的な分子の RNA の発現につき検討したところ、コントロールでは未分化細胞マーカーとそれぞれの細胞の特異的なマーカーの発現も認められなかった。肝臓、脳、脊髄では未分化マーカーの発現は抑制され、肝臓であれば AFP や AAT、脳と脊髄では GFAP や CNPase の発現が認められた。一方、心臓、腎臓では未分化マーカーの発現は抑制されるが、特異的なマーカーの発現は有意な結果はなかった。膵臓、脾臓、唾液腺では、未分化細胞のマーカーの抑制、ならびにそれぞれに特異的なマーカーの発現に有意な結果は得られなかった。

この結果は切片上への iPS 細胞の定着の過程で、定着が安定せず凍結切片のもつ分化誘導刺激が十分に iPS 細胞へ作用しなかったと考えられる。これまでの結果から、凍結切片上のいくつかの因子が複合的に iPS 細胞の分化誘導に有意に働くことは証明されてきている。今後は他の切片上でも安定的にこの因子が作用できるような方法を検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------