

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890139

研究課題名(和文) 遺伝性顎口腔疾患特異的ヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダーでの樹立と発症機序研究

研究課題名(英文) Generation of disease-specific human induced pluripotent stem (iPS) cells of a patient with Cleidocranial dysplasia in serum- and feeder-free defined culture.

研究代表者

山崎 佐知子 (Yamasaki, Sachiko)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：00632001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝性疾患の発症メカニズムを明らかにし、診断・治療法を確立するため、遺伝性疾患(鎖骨頭蓋異形成症：CCD)患者由来iPS細胞をフィーダーレス無血清培養系にて樹立し機能解析を行い、疾患モデル系を確立することで、発症メカニズムの解明および治療法の開発を行った。また、ヒトiPS細胞の未分化性および多分化能を維持可能な無血清培養法の改良およびヒトiPS細胞誘導法の改善についても検討を行い、無血清培地にてフィーダー細胞を用いず安定して維持可能な条件を確立した(Yamasaki S, et al. PLoS ONE 2014;9:e87151)。

研究成果の概要(英文)：Human ESCs and iPSCs are commonly maintained on mouse feeder cells in medium supplemented with FBS or proprietary replacements. Use of culture media containing undefined or unknown components has limited the development of applications for pluripotent cells. Therefore we developed a serum-free medium hESF9. We have successfully generated hiPSCs with retroviral vectors or sendai virus vectors in serum- and feeder-free defined medium on fibronectin. As a result we successfully generated hiPSCs using human dental pulp cells from cleidocranial dysplasia (CCD), moreover the cells retained pluripotency. As this simple serum-free adherent monoculture system will allow us to elucidate the cell responses to growth factors under defined conditions, and can eliminate the risk might be brought by undefined pathogens. In addition, CCD-iPSCs would be beneficial to clarify the molecular mechanism involved in the disease.

研究分野：再生医療

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：iPS細胞

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学、外科系歯学

キーワード：人工多能性幹細胞、再生歯学、遺伝子疾患、細胞培養

1. 研究開始当初の背景

一般的にヒト胚性幹(Embryonic Stem:ES)細胞や人工多能性幹(induced pluripotent stem: iPS)細胞は、フィーダー細胞(支持細胞)上で血清添加培地を用いて培養されているが、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る。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 細胞の樹立および培養を試みた。

2. 研究の目的

現在、ヒト iPS 細胞や ES 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ている。しかし、血清やフィーダー細胞はロットによる不安定性や異種抗原・感染性因子の混入等の問題があり、培養条件に不定要素が多く、再生医療への応用は非常に危険である。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治療法の確立が不十分な疾患も多いため、遺伝性疾患患者由来の iPS 細胞を、無血清・無フィーダー培養系にて樹立することで、より安全な再生医療への臨床応用を実現し、さらに詳細な発症メカニズムの解明および治療法開発を行った。

3. 研究の方法

無血清培養条件の改良

本研究において無血清培地(hESF9)にてフィーダー細胞を用いず樹立されたヒト iPS 細胞を長期間継代・維持し未分化性および多分化能の検討を行う。長期間本無血清培地にて安定して維持できるような条件を探索し、確立を目指した。長期継代後の細胞における未分化マーカー遺伝子および蛋白発現の確認、三胚葉への分化誘導を行い RT-PCR や FACS、酵素抗体法等を用いて特性解析を行った。また、各種分化誘導因子を用いて特定の細胞系列への分化誘導法を検討し、各分化誘導因子の最適濃度を探索し、効率的な分化誘導法の開発を検討した。なお、無血清培地にて樹立したヒト iPS 細胞は、フィーダー細胞上で血清添加培地を用いて誘導を行う従来の培養方法で樹立した場合と比較し、コロニー選抜の際に邪魔となる iPS 細胞になりきれない細胞が減少し、高品質な iPS 細胞を誘導可能であるため、樹立効率の改善も視野に入れて検

討を行った。

鎖骨頭蓋異形成症(CCD)患者由来疾患特異的 iPS 細胞を用いた発症メカニズムおよび原因究明

CCD は Runx2 の変異により発症する常染色体優性遺伝であり、顎顔面口腔領域を含めた骨・軟骨分化に異常を認める疾患である。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、樹立した疾患特異的 iPS 細胞を用いて、標準化された培養系にて比較検討を行い、骨・軟骨への分化誘導を行った。また、健康人由来のヒト iPS 細胞から同一条件にて分化誘導を行った場合と比較検討することで、詳細な疾患病態解明や治療法の開発への寄与を目指した。

4. 研究成果

本研究では、遺伝性疾患の発症メカニズムを明らかにし、その診断・治療法を確立するため、遺伝性疾患患者由来 iPS 細胞をフィーダーレス無血清培養系にて樹立し機能解析を行い、疾患モデル系を確立することで、発症メカニズムの解明および治療法の開発を行うことを目的としており、以下のとおり実施した。

ヒト iPS 細胞の未分化性および多分化能を維持可能な無血清培養法の改良およびヒト iPS 細胞誘導法の改善について検討を行い、無血清培地にてフィーダー細胞を用いず安定して維持可能な条件を確立すると共に、継代後の未分化能および多分化能を有することを確認した (Yamasaki S, et al. PLoS ONE 2014; 9: e87151 にて報告)。

さらに、樹立した鎖骨頭蓋異形成症(CCD)患者由来疾患特異的 iPS 細胞を用い、骨・軟骨細胞系列へ分化誘導を行い、健康人由来 iPS 細胞と比較検討を行った。無血清培地にて樹立された CCD 患者由来疾患特異的 iPS 細胞において、未分化性および多分化能の検討を行い、骨・軟骨への分化誘導時に健康人由来 iPS 細胞と比較して分化効率に差異があることが明らかとなった。CCD の原因遺伝子 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り、CCD 患者由来細胞では分化誘導時に Runx2 および Coll10A1 両遺伝子発現の有意な発現低下を認めた。また、試料提供を受けた CCD 患者は Runx2 Exon3 のミスセンス変異を認めるため、(R225Q、674G>A)を正常化する人工ヌクレアーゼ (TALEN) の構築を行った。現在、TALEN を用いて CCD-iPS 細胞のゲノム編集を行い、変異遺伝子配列を正常化した細胞の取得を目指している。

また本無血清培養系を用いて得られたヒト iPS 細胞はフィーダー細胞や血清添加培地

を用いることなく樹立可能であったが、同培地を改良し、当初予定していたヒト iPS 細胞樹立後の継代・維持に有利な添加因子の検討を行い、長期間未分化能および多分化能を維持可能な条件を確立した。また CCD 患者由来疾患特異的 iPS 細胞の変異遺伝子配列をターゲットとした遺伝子改変技術を用いてゲノム編集を行い、変異遺伝子の正常化し、遺伝子改変した iPS 細胞を用いた発症メカニズムの究明および治療法の開発研究について検討を行う予定である。

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 10 件)

1. S YAMASAKI, Y TAGUCHI, A SHIMAMOTO, H MUKASA, H TAHARA, T OKAMOTO. Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF- β 1 regulation of pluripotency PLoS ONE 9(1) 2014 e87151 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0087151

2. S YAMASAKI, K NABESHIMA, Y SOTOMARU, M K FURUE, J D SATO, T OKAMOTO. Long-term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem cells in serum-free and feeder-free defined medium Int. J. Dev. Biol. 57(9-10) 2013, 715-724 doi: 10.1387/ijdb.130173to. 査読有

3. 吉岡幸男、虎谷茂昭、伊藤翼、山崎佐知子、藤井良典、小泉浩一、林堂安貴、岡本哲治 多科連携により初期治療と欠損部の再建を行った重症口腔顎顔面外傷の一例 口腔顎顔面外傷第 12 巻 2013, 37-43 査読有

4. H Mukasa, S Yamasaki, Y Taguchi, A Shimamoto, H Tahara, T Okamoto. Generation of disease-specific human induced pluripotent stem (iPS) cells from dental pulp cells of a patient with Cleidocranial dysplasia in serum- and feeder-free culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, Vol. 49 2013, 44-45

5. Y Taguchi, S Yamasaki, H Mukasa, A Shimamoto, H Tahara, T Okamoto. Generation and serial cultivation of induced pluripotent stem cells from dental pulp cells in serum-free and feeder-free defined culture. In Vitro Cellular & Developmental

Biology-Animal, Vol.49 2013, 45

6. 神田拓、虎谷茂昭、山崎佐知子、伊藤奈七子、小川郁子、岡本哲治. 頬部腫脹を契機に診断されたネフローゼ症候群を伴った木村病の 1 例. 口腔外科学会誌第 59 巻第 2 号 83-87 2013 査読有

7. 向笠英恵、山崎佐知子、田口有紀、嶋本顕、田原栄俊、岡本哲治 鎖骨頭蓋異形成症患者歯髓由来細胞を用いた疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立 日本口腔組織培養学会誌第 22 巻第 1 号 15-16(2013)

8. Y Yukio, I OGAWA, T Tsunematsu, T SAKAUE, S YAMASAKI, Y FUKUI, Y HAYASHIDO, S TORATANI, T OKAMOTO. Ectomesenchymal chondromyxoid tumor of the tongue: Insights on histogenesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 115(2):223-240(2012) 査読有

9. YAMASAKI S, SHIMAMOTO A, TAHARA H, OKAMOTO T. Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in serum- and feeder-free defined culture from fetal lung fibroblasts and dental pulp. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal Volume 48, 48-49(2012)

10. 小川郁子・常松貴明・安藤俊範・大林真理子・山崎佐知子・高田 隆 筋上皮癌との鑑別を要した ectomesenchymal chondromyxoid tumor の 1 例. 日本唾液腺学会誌第 53 巻 40(2012)

[学会発表](計 13 件)

1. 濱田充子、山崎佐知子、赤木恵理 大高真奈美、西村健、中西真人 岡本哲治. センダイウイルスを用いた無血清培養系における hiPS 細胞の樹立と維持. 第 50 回日本口腔組織培養学会総会 2013/11/24, 日本歯科大学生命歯学部九段ホール、東京

2. S YAMASAKI/ T OKAMOTO. Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in serum- and feeder-free defined culture from dental pulp cells. 5th Hiroshima conference on Education and Science in Dentistry 2013/10/12 広島国際会議場、広島

3. H Mukasa, S Yamasaki, Y Taguchi, A Shimamoto, H Tahara, T Okamoto. Generation of disease-specific human induced pluripotent stem (iPS) cells from dental pulp cells of a patient with Cleidocranial dysplasia in serum- and

feeder-free culture. 2013 In Vitro Biology Meeting 2013/6/16 Providence, Rhode Island, USA

4. Y Taguchi, S Yamasaki, H Mukasa, A Shimamoto, H Tahara, T Okamoto. Generation and serial cultivation of induced pluripotent stem cells from dental pulp cells in serum-free and feeder-free defined culture. 2013 In Vitro Biology Meeting 2013/6/16 Providence, Rhode Island, USA

5. 田口有紀 山崎佐知子 嶋本顕 向笠英恵 田原栄俊、岡本哲治 単層無血清培養系での歯髄由来細胞を用いたヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)の樹立および維持. 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2013/5/23 栃木県総合文化センター、栃木

6. 向笠英恵 山崎佐知子 田口有紀 嶋本顕 田原栄俊 岡本哲治 鎖骨頭蓋異形成症患者歯髄由来細胞を用いた疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)の樹立. 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2013/5/23 栃木県総合文化センター、栃木

7. Mukasa H, Yamasaki S, Okamoto T, et al. Generation of disease-specific human induced pluripotent stem (iPS) cells from dental pulp cells of a patient with Cleidocranial dysplasia in serum-and feeder-free culture. The 2th International Symposium Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster 2013/2/10 広島国際会議場

8. TAGUCHI Y, YAMASAKI S, SHIMAMOTO A, TAHARA H, OKAMOTO T. Generation of induced pluripotent stem cells from dental pulp cells in serum-free and feeder-free culture condition. The 2th International Symposium Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster 2013/2/10 広島国際会議場

9. 小川郁子・常松貴明・安藤俊範・大林真理子・山崎佐知子・高田 隆. 筋上皮癌との鑑別を要した ectomesenchymal chondromyxoid tumor の 1 例 第 57 回日本唾液腺学会学術大会 2012/12/1 文京学院大学本郷キャンパス

10. 向笠英恵、山崎佐知子、田口有紀、嶋本顕、田原栄俊、岡本哲治 鎖骨頭蓋異形成症患者歯髄由来細胞を用いた疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)の樹立 第 49 回日本口腔組織培養学会 2012/11/17 広島大学 広仁会館

11. YAMASAKI S, SHIMAMOTO A, TAHARA H, OKAMOTO T. Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in serum-and feeder-free defined culture from fetal lung fibroblasts and dental pulp cells derived from a patient with cleidocranial dysplasia. 2012 World congress on In Vitro Biology 2012/6/3 Bellevue, Washington, USA

12. 山崎佐知子、嶋本顕、田原栄俊、岡本哲治. 鎖骨頭蓋異形成症患者歯髄由来細胞を用いた疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)の樹立. 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2012/5/18 広島国際会議場

13. 田口有紀、山崎佐知子、嶋本顕、田原栄俊、岡本哲治. ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)の単層無血清培養系の確立. 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2012/5/18 広島国際会議場

〔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：
出願年月日：
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・大学病院・歯科診療医

研究者番号 : 00632001