

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670862

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞からのがん幹細胞誘導の試み

研究課題名(英文) Study of the cancer stem cell induction from the human iPS cell

研究代表者

柴田 敏之 (SHIBATA, TOSHIYUKI)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50226172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、良いiPS細胞を得るためのがん化を検討した。その結果、ヒト歯髄幹細胞の細胞初期化直後の上皮系marker (E-cadherin)の発現増強(上皮間葉転換：EMT)とDLX4 (TGF- β のシグナル伝達に係わる因子)の発現が初期化に深く関与し、がん悪性形質獲得にも類する現象を見出した。また、TGF- β 刺激下でiPS誘導を行った所、有意な誘導効率の低下を観察し、DLX4はTGF- β シグナルのsmad以外の経路で関与している可能性を得た。また、がん細胞がiPS細胞に及ぼす影響を検討する過程において、培養液因子によりiPS細胞の誘導性に変化が生じる現象を見出した。

研究成果の概要(英文)：One of final purpose of this study is to establish the safety procedure of iPS cells avoiding the carcinogenesis. Our new knowledges from this study are as follows; In the high efficiency of iPS cells and the induction of high quality iPS cells from Dental Pulu Stem Cells (DPSC), enhancement of epithelial marker (E-cadherin), that is epithelial and mesenchymal translation, and enhancement of DLX4 expression (DLX4 is engaged in the TGF- β signal translation) play an important roles in the iPS cell induction efficiency avoiding malignant progression. Furthermore, we carried out the iPS cell induction under TGF- β stimulation. TGF- β stimulation significantly reduced the efficiency of iPS cell induction without the alternation of smad signals. During the analysis of cancer cell effects on the iPS cells, culture conditioned medium possibly affect the iPS cell nature itself including differentiation ability.

研究分野：口腔外科

キーワード：iPS細胞 ヒト歯髄細胞

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞(Cancer Stem Cells: CSCs)は1997年に白血病で、その存在が証明された後、多くのがんで報告され、頭頸部領域の扁平上皮がん(SCC)も他の消化器癌と同様に、CD44+がん細胞がSCCのCSCsであるとの報告もなされて来ている。これらCSCsは、再発・転移・薬剤耐性に深く関与するとされ注目されているが、表面マーカーによるCSCsの識別を含め不明な点が残されている。一方、再生医療の分野ではiPS細胞が開発され、細胞の分化が人為的に未分化に誘導されること(細胞初期化)が示されている。また、誘導されたiPS細胞の中にはがん化するものがあり再生医療材料としての課題を投げ掛けている。2012年になり、マウスiPS細胞からCSCsの誘導に成功したとの報告がなされた。即ち、マウスiPS細胞を4種類のがん細胞株(Lewis lung carcinoma: LLC、mouse embryonal carcinoma:P19、mouse melanoma:B16、mouse mammary carcinoma:MC.E12)の培養上清を添加し4週間培養後、ヌードマウスに移植したところ、各々のがんの性質を有するがん組織の形成が認められ、これらのがん組織から得られた細胞は、浮遊培養でsphereを形成し(CSCsの特徴の一つ)、*in vivo*で造腫瘍性・転移性の獲得が示されている。この報告は、マウスの系において「線維芽細胞から誘導されたiPS細胞からCSCsが誘導された」ことを示し、ヒト歯髄組織幹細胞(Dental Pulp Stem Cell: DPSC)から誘導されるiPS細胞に於いてもヒトOSCCのCSCsが誘導される可能性を強く示唆していると考えられる。また、マウスiPS細胞を凍結標本上で培養すると接する組織に類似した細胞に分化する現象も知られる様になって来ているが、ヒトiPS細胞で同様の現象が観察されるか否か不明となっている。

2. 研究の目的

近年、幹細胞の性質を持ったがん細胞、即ち、がん幹細胞(CSCs)の存在が報告され注目を集めている。一方、再生医療の分野ではiPS細胞が開発され研究展開されているが、『がん化』の問題が生じている。2012年にマウスの系で、iPS細胞にがん細胞株の培養上清を加えて培養・移植した所、通常の奇形種ではなく、培養したがん細胞に類似する腫瘍形成が認められ、これが『がん幹細胞モデル』になることが報告されている(Plos one)。また、マウスiPS細胞を凍結標本上で培養すると接する組織に類似した細胞に分化する現象も知られて来ている。我々もヒト歯髄幹細胞(Dental Pulp Stem Cell: DPSC)からのiPS細胞誘導効率促進およびがん化しないiPS細胞誘導を解析する過程に於いて、細胞初期化直後の上皮系marker(E-cadherin)の発現増強(上皮間葉転換: EMT)とDLX4(TGF-βのシグナル伝達に係わる因子:TGF

βはEMTに係わることが知られている)の発現が初期化に深く関与し、がん悪性形質獲得の解析にも応用可能な良いiPS細胞と悪いiPS細胞(がん化の可能性の高い形態的に不整なコロニー形成 etc)の誘導に関与している可能性を観察して来ている。

今回、各種ヒト口腔扁平上皮がん細胞(OSCC)株の培養上清をiPS細胞の誘導過程・分化誘導過程に加え、iPS細胞の『がん化』を観察し、OSCCのCSCsモデルの作成が可能か否かの検討を行う。また、これと共に、再生医療における克服すべき課題であるiPS細胞の「がん化」を発がんの見地からある種の「発がんモデル」と捉え、iPS細胞のがん化を避ける因子・方策とがん化を促進する因子・方策を検討し、「がん細胞」と「がん細胞」の境界も探る。さらに、TGF-β刺激下でのiPS細胞誘導とTGF-βのシグナル伝達様式の解析を行いDLX4の果たしている役割の一端を探る。

3. 研究の方法

ヒトDPSCを用い、山中4因子(DPSCはc-Mycを除いてもiPS細胞が誘導されるが、本研究では誘導されるiPS細胞ががん化し易い状態とするために敢えて加えて行く)にて細胞初期化を行いiPS細胞を誘導する。その後、上皮系細胞への分化誘導を行う。これらの各過程においてヒトOSCCの培養上清(分泌因子)を添加し、iPS細胞の『がん化』に及ぼす影響およびiPS細胞誘導後の上皮系細胞への分化誘導過程で正常分化が阻害されるか否かを*in vitro*、*in vivo*で解析する。これと共に、DPSCを細胞初期化した場合に不良なiPS細胞が誘導される割合の高いDPSCとそうでないDPSC(これは細胞初期化され易いものとそうでないものとも云える)において、相関して発現されているDLX4の消長とを比較検討する。

4. 研究成果

再生医療の分野でiPS細胞が開発され研究展開されているが、良いiPS細胞と悪いiPS細胞(がん化)の問題が生じている。本研究の最終的な狙いの一つとして、良いiPS細胞を得るためにがん化を検討することにある。その結果、ヒト歯髄幹細胞(Dental Pulp Stem Cell: DPSC)からのiPS細胞誘導効率促進およびがん化しないiPS細胞誘導を解析する過程に於いて、細胞初期化直後の上皮系marker(E-cadherin)の発現増強(上皮間葉転換: EMT)とRLX4(TGF-βのシグナル伝達に係わる因子:TGFβはEMTに係わることが知られている)の発現が初期化に深く関与し、がん悪性形質獲得にも類する現象を確認した。即ち、iPS細胞誘導効率を支配する新たな因子(DLX4)は、高発現している細胞ないし強制発現させると誘導効率が有意に向上し、良質化(形態の整ったコロニーの出現)も得られることが示された。

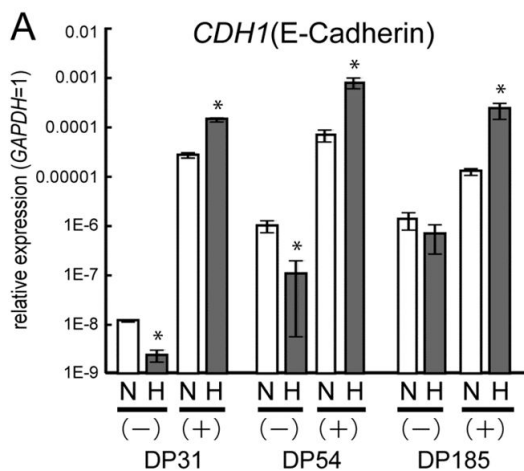
下図(図1)は、低酸素条件(DPSCをiPS細胞化した場合に有意に誘導効率の上がる条件)で発現増強の見られる遺伝子群(DNA array)の結果を示す。

図1

Group III (3%O ₂) > Group I (21%O ₂)		
GeneSymbol	Genbank	Fold
ANKRD24	NM_133475	38.43
CBLC	NM_012116	30.23
GFRA2	NM_001495	25.99
ATP9A	NM_006045	17.16
EGLN3	NM_022073	12.33
SORBS1	AK022468	8.91
ANGPTL4	NM_139314	8.88
LILRA3	NM_006865	8.81
PTPRB	NM_002837	7.96
SFTPA1	NM_005411	7.95
CCR4	NM_005508	7.38
OCLN	NM_002538	7.12
SMPD3	NM_018667	7.02
CA9	NM_001216	6.45
IGFBP3	NM_001013398	6.37
INHBB	NM_002193	3.34
CDH1(E-Cadherin)	NM_004360	5.75
AQP1	NM_198098	5.56
FAM189A2	NM_004816	5.45
MCHR1	NM_005297	5.30
APLN	NM_017413	5.18

上記の結果より、CDH-1 (E-Cadherin)に着目し、iPS細胞誘導効率とE-Cadherin発現の相関性を解析した所、図2の如くHypo(低酸素条件)で誘導効率の高かった群に於いて相関して発現が高くなっていった。また、形成されるコロニーも形状が安定した球形を呈する割合が有意に高くなっていった。このことは、iPS細胞誘導時においてDPSCの上皮移行(E-Cadherinの発現が増強されている状態)が、DPSCのiPS細胞移行(誘導)に於いて促進的であり、かつ良質なコロニー(がん化の可能性が低減されているiPS細胞)を誘導している可能性を示唆した。

図2



また、iPS誘導効率の高いcell lineと悪いcell lineにおいて、高いcell lineで強く

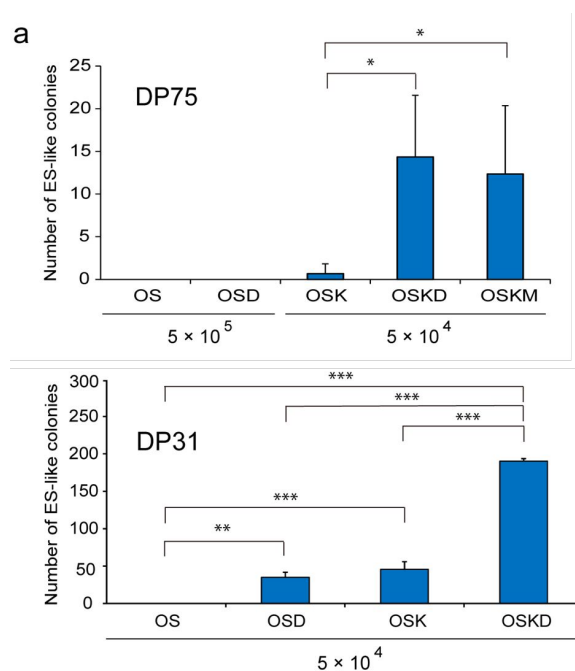
発現している遺伝子をDNA arrayにて比較検討した所、図3の如くDLX4がclose upされた。

図3

Ratio	Gene Symbol	Gene ID	Official Full Name
38.1	<i>CD24</i>	100133941	CD24 signal transducer
35.1	<i>DLX4</i>	1748	distal-less homeobox 4, transcript variant 1
32.1	<i>NPTX2</i>	4885	neuronal pentraxin II,
26.2	<i>FGF13</i>	2258	fibroblast growth factor 13, transcript variant 1
21.7	<i>CPE</i>	1363	carboxypeptidase E
20.1	<i>SOX11</i>	6664	SRY (sex determining region Y)-box 11
16.2	<i>RBP1</i>	5947	retinol binding protein 1, cellular, transcript variat

そこで、DLX4を遺伝子導入し、iPS細胞誘導効率の変化を検討した所、下図(図4)の如く誘導効率の有意な向上が観察された。また、良質なiPS細胞コロニーが形成されていた。

図4



結果は示していないが、このDLX4はヒト歯髄細胞のみならず広くiPS細胞研究に用いられているヒト皮膚線維芽細胞でも同様の作用を示すことが示され、広く一般的な細胞のiPS細胞誘導に於いても重要な役割を担っている可能性を示唆していた(Science report 2014)。DLX4は詳細について不明の部分も多いが、上皮間葉転換に深く関わるTGFのシグナル伝達に介入することが示されて来ている。そこでTGF刺激下でiPS誘導を行った所、有意な誘導効率の低下を観察した。また、細胞間のsmadシグナルを調べた限りでは、差はなく、DLX4はTGFシグナルの他の経路に介入している可能性が示唆された(投稿準備中)。また、がん細胞がiPS細胞に及ぼす影響を検討する過程において、培養液因子によりiPS細胞の誘導性に変化が生じる現象も見出した(PLoS One. 2014)。

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 4 件)

Hino M, Kamo M, Saito D, Kyakumoto S, Shibata T, Mizuki H, Ishisaki A.
Transforming growth factor- β 1 induces invasion ability of HSC-4 human oral squamous cell carcinoma cells through the Slug/Wnt-5b/MMP-10 signalling axis.
Journal of Biochemistry 2016 1-10
doi:10.1093/jb/mvw007 査読あり

Kudo D, Inden M, Sekine S, Tamaoki N, Iida K, Naito E, Watanabe K, Kamishina H, Shibata T, Hozumi I.
Conditioned medium of dental pulp cells stimulated by Chinese propolis show neuroprotection and neurite extension in vitro.
Neurosci Lett. 2015 Mar 4;589:92-7.
doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.035. Epub 2015 Jan 15. 査読あり

Takeda-Kawaguchi T, Sugiyama K, Chikusa S, Iida K, Aoki H, Tamaoki N, Hatakeyama D, Kunisada T, Shibata T, Fusaki N, Tezuka K.
Derivation of iPSCs after culture of human dental pulp cells under defined conditions
PLoS One. 2014 Dec 18;9(12):e115392
doi: 10.1371/journal.pone.0115392. eCollection 2014. 査読あり

Tamaoki N, Takahashi K, Aoki H, Iida K, Kawaguchi T, Hatakeyama D, Inden M, Chosa N, Ishisaki A, Kunisada T, Shibata T, Goshima N, Yamanaka S, Tezuka K.
The homeobox gene DLX4 promotes generation of human induced pluripotent stem cell
Scientific Reports. 2014 Dec 4;4:7283
doi: 10.1038/srep07283 査読あり

[学会発表](計 5 件)

柴田 敏之
Hypermethylation status of oral cancer and Dental pulp stem cell biology as a new resource for the regenerative medicine.
第 27 回台湾顎顔面口腔外科学術大会 (2015/3/6,台湾・台北市)

N Tamaoki, K Takahashi, H Aoki, K Iida, T Kawaguchi, D Hatakeyama, M Indan, N Chousa, A Isisaki, T Kunisada, T Shibata, N Gotou, S Yamanaka, K Tezuka
The homeobox gene DLX4 promotes generation of human induced pluripotent stem cells
ASBMR (アメリカ骨代謝学会)

2014 年 09 月 12 日 ~ 16 日
アメリカ・テキサス州ヒューストン

柴田 敏之
iPS 細胞による再生医療の展望・・・ヒト歯髄幹細胞の有用性について
第 42 回日本口腔外科学会教育研修会
大阪歯科大学講堂(2014/7/27,大阪府枚方市)

柴田 敏之
ヒト成人歯髄細胞の幹細胞性と iPS 細胞誘導
第 13 回日本再生医療学会総会
国立京都国際会議場 (2014/3/6,京都府京都市)

柴田 敏之
iPS 細胞による再生医療の展望・・・ヒト歯髄幹細胞の有用性について
第 41 回日本口腔外科学会教育研修会
日本大学会館 (2014/2/23,東京都千代田区)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 5 件)

名称: Method for producing induced pluripotent stem cells
発明者: SHIBATA T.
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 14839864.7-1404
出願年月日: 2016 年 01 月 16 日
国内外の別: 国内

名称: 人工多能性幹細胞の作製方法
発明者: 手塚建一、玉置也剛、川口知子、柴田敏之、國貞隆弘、青木仁美、五島直樹(岐阜大学、産業技術総合研究所共同出願)

権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2013-176647
出願年月日: 平成 25 年 8 月 28 日
国内外の別: 国内

名称: 神経損傷の治療用移植材の製造方法
発明者: 手塚建一、福光秀文、川口知子、柴田敏之、國貞隆弘、古川昭栄

権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2013-102426
出願年月日: 平成 25 年 5 月 14 日
国内外の別: 国内

名称: 人工多能性幹細胞の作製方法
発明者: Tezuka K, Tamaoki N., Kawaguchi T., Shibata T., Kunisada T., Aoki H., Goshima, N. (岐阜大学、産業技術

総合研究所共同出願国際特許)

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/2014/072564

出願年月日：2014/8/28

国内外の別： 国外

名称：人工多能性幹細胞の作製方法；
発明者：Tezuka K, Fukumitsu H. Kawaguchi T.
, Shibata T., Kunisada T., Furukawa
S.

権利者：同上

種類：特許 (国際出願)

番号：PCT/2014/062881

出願年月日：2014/5/14

国内外の別： 国外

取得状況 (計 1 件)

名称：

発明者：Tezuka K, Shibata T., Kunisada T,
Tamaoki N., Takeda T., Yamanaka S,
Takahashi K

権利者：同上

種類：特許

番号：2011(PCT/JP2008/068320)

Korea Patent 2011-7003453,

Canada Patent CA2732401

取得年月日：2014年6月6日

国内外の別： 国内・国外

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 敏之 (SHIBATA Toshiyuki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：5 0 2 2 6 1 7 2

(2) 研究分担者

川口 知子 (KAWAGUCHI Tomoko)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：3 0 5 0 9 8 1 5

飯田 一規 (IIDA Kazuki)

岐阜大学・医学部附属病院医員・助教

研究者番号：3 0 5 8 5 2 3 7

玉置 也剛 (TAMAOKI Naritaka)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：4 0 5 8 5 3 0 3