

平成 29 年 5 月 31 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：2015～2016

課題番号：15H06435

研究課題名(和文) インテグレーションフリー・無血清培養系での歯原性腫瘍由来iPSCの誘導と病態解明

研究課題名(英文) Generation of odontogenic tumor specific iPSCs in virus integration-, feeder-, and serum- free defined culture and their use for disease model study

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：発症メカニズムは不明である歯原性腫瘍を、全組成の明らかな当科で開発した無血清培地で初代培養し、宿主ゲノムに遺伝子挿入のないセンダイウイルスベクターを用いて初期化し、歯原性腫瘍iPSCを樹立した。さらに、病態モデルを確立するため、iPSCを歯原性腫瘍の由来の一つとして考えられている神経堤細胞への誘導する方法を、完全無血清条件下で各種因子の添加及び培養法の組み合わせで検討した。本研究より得られる知見は、歯原性腫瘍の病態解明や発症機序の解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to establish iPSCs from odontogenic tumor in integration-, serum-, feeder-free condition. Though pathogenic mechanism of odontogenic tumor is unknown, neural crest cells were considered as one of the origins of odontogenic tumor. In order to establish a disease model, we examined how to induce iPSC into neural crest cells in complete serum free condition. We believe that our iPSC derived from odontogenic tumor will contribute to elucidation of the pathogenesis of odontogenic tumor and elucidation of onset mechanism.

研究分野：口腔外科

キーワード：歯原性腫瘍 iPSC

1. 研究開始当初の背景

代表研究者の所属する研究室では、以前より不定要素を排除し、組成の明らかな培養条件による培養法の標準化が必要であることから、マウスおよびヒトの ES、iPS 細胞の未分化性と多分化能を、血清やフィーダー細胞を用いずに維持することが可能な単層無血清培地を報告してきた。さらにフィーダーフリー・無血清培養条件に加えて宿主ゲノムに遺伝子挿入のないセンダイウイルスベクターを用いてインテグレーションフリーの条件下、鎖骨頭蓋異形成症(CCD)、基底細胞母斑症候群(NBCC)、ヌーナン症候群 (NS) (ras 経路分子異常) など、複数の顎顔面口腔疾患の疾患特異的 iPS 細胞の誘導に成功している(図1)。また当研究室では、すでにエナメル上皮腫由来細胞やその他正常細胞の無血清培養を報告している。これらの成果に基づき、本研究では歯原性腫瘍由来 iPS 細胞を誘導し病態解明を目指した。

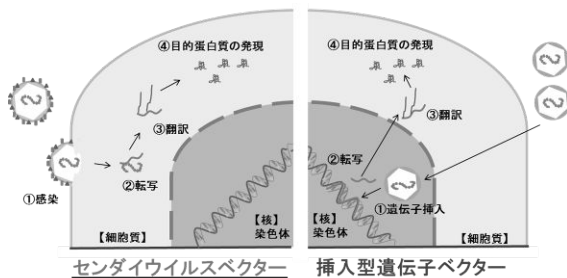


図1 センダイウイルスベクターと挿入型遺伝子ベクターの比較

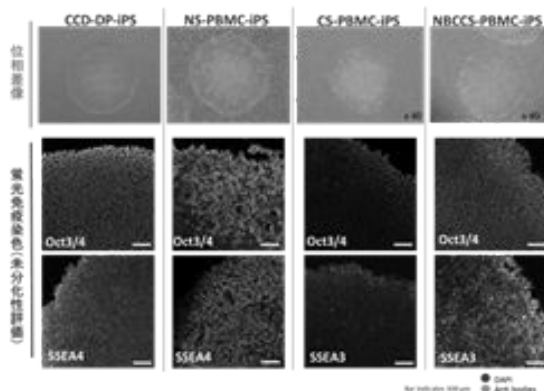


図2 各種疾患特異的 iPS 細胞

2. 研究の目的

本研究計画では、現在までに報告のない歯原性腫瘍由来細胞から iPS 細胞を誘導し、組織分化実験を行うことで発症メカニズムを明らかにし、診断・治療法開発を目指すことを目的とした。本研究で得られた成果は各種因子の正確な検討やより正確な病態解析による解明が可能になると考えた。

3. 研究の方法

(1) 歯原性腫瘍由来 iPS 細胞の樹立

無血清培地を用いて歯原性腫瘍の一つであるエナメル上皮腫の初代培養を行い、インテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養培地 (hESF9) を用いて歯原性腫瘍由来 iPS 細胞を誘導した。

初期化不十分で増殖性の高い細胞の増殖を制御するため、細胞密度を検討し最終的に図3の如く初期化を行った。

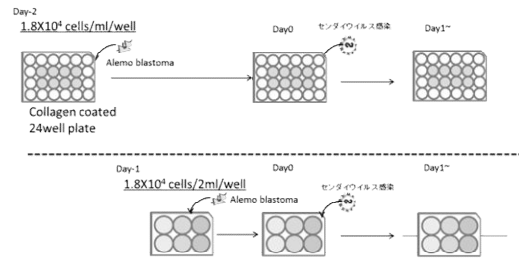


図3 初期化方法

(2) 歯原性腫瘍由来 iPS 細胞の特性解析

複数のクローンを樹立し、各 iPS 細胞の未分化性及び多分化能を *in vitro* 及び *in vivo* の系で評価した。分化誘導実験は *in vitro* では胚様体を介して、*in vivo* では、SCID マウス背部皮下移植系を用いてテラトーマ形成試験を行い検討した。

(3) 神経堤分化誘導実験

in vitro において完全無血清条件での神経堤細胞への分化誘導法を当科で開発した無血清培地を基礎培地として行う。添加因子として EGF, FGF-2, TGF- β 1, BMP2, BMP4, activin A, sonic hedgehog, Wnt, レチノイン酸, Noggin, SB431542 それぞ

れの組み合わせで検討し、胚葉体培養法、浮遊培養法を組み合わせ、神経堤細胞表面マーカーのひとつである CD271 陽性細胞の割合で評価した。なお、神経堤分化誘導実験は、健康人組織由来 iPSC を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 歯源性腫瘍由来 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・維持を行った(図4)。

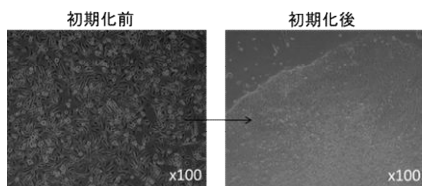


図4 初期化前後の位相差顕微鏡像

(2) 歯源性腫瘍由来 iPSC の特性解析

樹立した iPSC は未分化マーカー(Oct, Nanog, Sox2, Rex1) の遺伝子発現が陽性であり(図5) in vitro 分化誘導実験では蛍光細胞免疫にて AFP, SMA, β -tubulin 陽性を示し(図6) in vivo でも組織免疫にて消化管、軟骨、神経等陽性(図7)であることが示され、樹立した歯源性腫瘍由来 iPSC が三胚葉への分化能を有していることが明らかとなった。

図5 樹立した歯源性腫瘍由来

iPSC の未分化マーカーの遺伝子発現

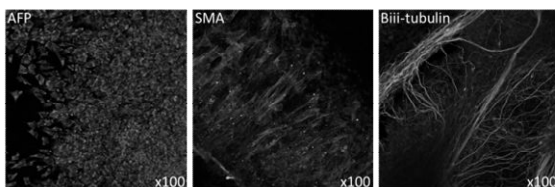
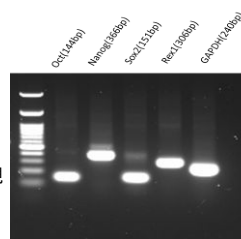


図6 蛍光免疫染色写真(in vitro 分化誘導)

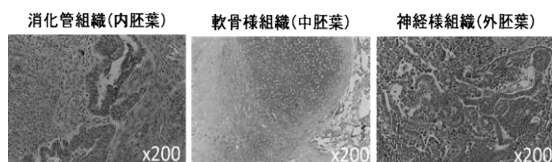


図7 テラトーマ組織免疫染色写真(in vivo 分化誘導)

(3) 神経堤分化誘導実験

誘導初期は胚葉体培養、誘導後期は浮遊培養、接着培養法とし、添加因子に様々な組み合わせの内、Wnt 及び TGF- 阻害剤等 4 因子の組み合わせが最も CD271 陽性細胞の割合が高く誘導可能であることを明らかとした(図8)。

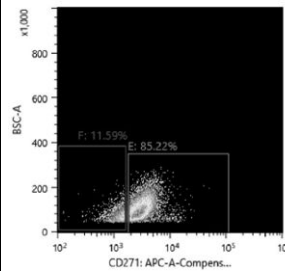


図8 FACS data(神経堤誘導後、CD271 陽性細胞(E 領域))

インテグレーションフリー条件で、今までに報告のない歯源性腫瘍由来 iPSC を誘導できるようになり、初期化前後で同じ遺伝的背景を持つ iPSC の誘導が可能となった。歯源性腫瘍は、そのほとんどが良性腫瘍でありながら、周囲骨を吸収し破壊しつつ増大する一方で、多様な組織への分化能を有し、硬組織を形成するなど、高い分化能と組織誘導能を有することが知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない。今回樹立に成功した細胞より得られる知見は、歯源性腫瘍のみならず、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。

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)

- 濱田充子/ 赤木恵理/ 中峠洋隆/ 大林史誠/ 安井多恵子/ 山崎佐知子/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: インテグレーションフリー・フィーダーフリー・無血清培養系での疾患特異的 iPSC 細胞の樹立, 口腔組織培養学会誌 査読無 第 25 巻 1 号 23-24 頁, 2016
- 赤木恵理/ 山崎佐知子/ 濱田充子/ 中峠洋

隆/ 大林史誠/ 安井多恵子/ 大高真奈美/ 西村健/ 中西真人/ 岡本哲治: フィーダー細胞フリー・無血清培養系でのヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)の誘導と長期培養 — 宿主細胞およびウイルスベクターの比較-, 口腔組織培養学会誌 査読無 第 25 巻 1 号 21-22 頁, 2016

3. Sachiko Yamasaki, Atsuko Hamada, Eri Akagi, Hirotaka Nakatao, Manami Ohtaka, Ken Nishimura, Mahito Nakanishi, Tetsuji Okamoto: Generation of Cleidocranial dysplasia-specific induced pluripotent stem cells in integration-, feeder-, and serum-free culture, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 査読有 2016 Feb;52(2):252-64. DOI 10.1007/s11626-015-9968-x.

4. 赤木恵理/ 山崎佐知子/ 濱田充子/ 中峠洋隆/ 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フィーダー細胞フリー・完全無血清培養系での末梢血単核球からの hiPS 細胞の樹立と長期維持に関する研究, 口腔組織培養学会誌 査読無 第 24 巻 1 号 51-52 頁, 2015

[学会発表](計 3 件)

1. 濱田充子/ 赤木恵理/ 中峠洋隆/ 大林史誠 / 安井多恵子/ 山崎佐知子/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患モデル作成研究, 2016/4/17 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学会学術集会, 福岡, 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
2. 濱田充子/ 赤木恵理/ 中峠洋隆/ 大林史誠/ 安井多恵子/ 山崎佐知子/ 虎谷茂昭/ 岡本哲治: インテグレーションフリー・フィーダーフリー・無血清培養系での疾患特異的 iPS 細胞の樹立, 2015/11/21, 第 52 回口腔組織培養学会学術集会, 徳島

3. 赤木恵理/ 山崎佐知子/ 濱田充子/ 中峠洋隆/ 大林史誠/ 安井多恵子/ 大高真奈美/ 西村健/ 中西真人/ 岡本哲治: フィーダー細胞フリー・無血清培養系でのヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)の誘導と長期培養 — 宿主細胞およびウイルスベクターの比較-, 2015/11/21, 第 52 回口腔組織培養学会学術集会, 徳島

6 . 研究組織

(1)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