

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月13日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659369

研究課題名（和文） 無血清再集合培養法を用いたマウス ES 細胞およびヒト骨髄幹細胞からの顎骨・歯胚誘導

研究課題名（英文） Induction of Jaw Bone and Tooth Germ from murine embryonic stem cells and human bone marrow stem cells in serum-free defined suspension culture

研究代表者

岡本 哲治 ( OKAMOTO TETSUJI )

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00169153

研究成果の概要（和文）：従来、ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞は、不活性化したフィーダー細胞や血清などの動物由来成分を含む条件で培養されており、このような培養系では細胞増殖・分化制御機構や制御因子を検討することや、再生医療への応用は非常に困難である。本研究の結果、我々が開発した ESF7 および hESF9 培地を用いることで、フィーダー細胞や血清を用いずに、マウス ES、マウス iPS 細胞、ヒト iPS 細胞を誘導・培養する事に成功した。本培養系を用いることで、iPS 細胞の培養・維持が標準化できるとともに、増殖・分化を制御する各種因子の正確な検討が可能となる。さらに、再生・細胞治療のソースとしての安全性の向上や創薬スクリーニングへの応用が進み、安全で確実な再生医療の実現が可能となると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Human Embryonic Stem (hES) cells and human induced Pluripotent Stem (hiPS) cells are commonly maintained on inactivated mouse embryonic fibroblast as 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 because of the relative lack of knowledge regarding cell responses to differentiating growth factors. Therefore we developed a serum-free medium, designated hESF9, in which human ES cells can be maintained in undifferentiated state without feeder cells. We have developed a serum-free defined medium for culturing hiPS cells, which can maintain proliferation, self-renewal and 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.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：口腔外科学、細胞内分泌学、  
 科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：マウスES細胞、骨髄幹細胞、マウスiPS細胞、アクチビン、軟骨誘導、無血清培養

### 1. 研究開始当初の背景

現在、胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)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が、このような培養系では、細胞増殖・分化制御機構や制御因子を検討することは非常に困難である。また、再生医療への応用は困難である。そこで、フィーダー細胞を用いずに、マウス iPS 細胞およびヒト iPS 細胞の未分化性と多分化能を維持可能な無血清单層培養系を確立することが急務である。

### 2. 研究の目的

現在、胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)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が、このような培養系では、細胞増殖・分化制御機構や制御因子を検討することは非常に困難であり、またこのような培養条件で培養された細胞を用いた再生医療はさけるべきである。今回我々は、フィーダー細胞を用いずに、マウス iPS 細胞およびヒト iPS 細胞の未分化性と多分化能を維持可能な無血清单層培養系の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

我々は既にマウス ES 細胞の未分化性と多分化能を、フィーダー細胞を用いずに維持可能な無血清培地 ESF7 を開発し報告した。本研究では、マウス iPS 細胞の未分化性・多分化能を継代・維持可能なフィーダー細胞を用いずに維持可能な無血清培地を基礎にして、動物由来成分を含まず、無血清单層培養系の確立を目指した。さらにフィーダー細胞を用いずにヒト iPS 細胞の未分化性と多分化能を維持可能な無血清培地の開発を目指した。さらに同培地を用いて iPS 細胞の樹立についても検討した。

ヒト胎児肺線維芽細胞(TIG-3 細胞)および鎖骨頭蓋異栄養症由来歯髄細胞に、レトロウイルスを用いて4遺伝子を導入し無血清培地 hESF9 を基に、各種細胞外マトリックス上に播種し、hiPS の樹立を試みた。また、iPS 細胞誘導効率に及ぼすウイルス濃縮の効果によるについて検討し、ウイルス感染から樹立までの全過程において完全無血清培養系での hiPS 樹立の検討を行った。

### 4. 研究成果

マウス胎仔線維芽細胞由来iPS細胞(miPS: 理化学研究所cell bank)を用いて、マウスES細胞用に我々が開発した無血清培地ESF7を基に、同細胞の未分化性・多分化能を継代・維

持可能な無血清单層培養系を確立した。同培養系では、Oct3/4, Nanog, Sox-2, Esg1などの未分化マーカーの発現を認め、アルカリフォスファターゼ活性陽性を示した。さらに、長期継代培養(168代)後もこれらマーカーの発現を認めた。また、ラミニン処理プレートにて、ESF5培地(LIF, BSA不含)にFGF-2を添加すると、神経系マーカー(Nestin,  $\beta$ -III tubulin)陽性の神経細胞特有の突起を形成した。さらに頭部で発現するOTX-2, neural crest形成に關与するAP2の発現を認め、これら細胞は頭部の位置情報を持つ可能性が示唆された。さらに、胚様体内においても神経系マーカー陽性反応を認めた。また、免疫不全マウス移植細胞は三胚葉へ分化したテラトーマ(奇形腫)を形成した。

ヒト線維芽細胞から安定してヒトiPS細胞を作製することに成功した。またコロニーは感染後約2週間で出現し、未分化の指標の1つであるアルカリフォスファターゼ活性陽性を示した。さらに、ヒト(日本人女性)胎児肺線維芽細胞TIG-3細胞に、レトロウイルスを用いて4遺伝子(Oct3/4, Sox2, KLF-4, c-MYC)を導入し、我々がヒトES細胞用に開発・報告した、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hESF9を基に、各種細胞外マトリックス(type1collagen, gelatin, fibronectin, Laminin)上に播種した。

さらに、hESF9無血清培地を用いて、フィーダー細胞を用いず鎖骨頭蓋異栄養症由来歯髄細胞に、レトロウイルスを用いて4遺伝子(Oct3/4, Sox2, KLF-4, c-MYC)を導入し、ヒトiPS細胞を誘導することに成功した。またiPSコロニーは感染後約2週間で出現し、未分化の指標の1つであるアルカリフォスファターゼ活性陽性を示した。また、ウイルス感染から樹立までの全過程を完全無血清培養系にて行いhiPSを誘導できることができた。また、これら細胞は、ヌードマウスにおいてテラトーマ形成をした。また、embryo body培養法にて3胚葉への分化能を有していることが明らかとなった。

従来、ES細胞やiPS細胞などの幹細胞は、不活性化したフィーダー細胞や血清などの動物由来成分を含む条件で培養されており、各種異種抗原の混入の恐れがあり、再生医療への応用は困難である。本研究の結果、マウスESやヒトES用に開発したESF7およびhESF9培地を用いることで、フィーダー細胞や血清を用いずに、マウスおよびヒトiPS細胞を誘導し長期培養する事に成功した。本無血清培地を用いる事で、マウスおよびヒトiPS細胞の増殖・分化を制御する各種因子の検討が標準化

できるとともに、従来のヒトiPS細胞培養系では、フィーダー細胞や動物由来成分の使用により各種異種抗原の混入の恐れがあるが、ヒトiPS細胞の増殖・分化を制御する各種因子の検討が標準化できるとともに、移植医療のソースとしての安全性の向上や創薬スクリーニングへの応用といった、安全で確実な再生医療の実現が可能となると考えられた。

#### 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 11 件)

1. Novel cytotoxic polyoxygenated steroids from an Okinawan Sponge, *Dysidea* sp. Sudhakar, V.S., Yukio Yoshioka, Tetsuji Okamoto, Makoto Ojika, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (5), 999-1002, 2012.
2. Cyclolobatriene, a Novel Prenylated Germacrene Diterpene, from the Soft Coral *Lobophytum pauciflorum*, Sudhakar V. S. Govindam, Yukio Yoshioka, Akihiko Kanamoto, Takeshi Fujiwara, Tetsuji Okamoto, Makoto Ojika, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Jan 15;20(2):687-92.2012.
3. ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の単層無血清培養系の確立、嶋本顕/木村直大/田原栄俊/岡本哲治、日本口腔組織培養学会誌第21巻第1号31-32頁
4. Prospect of mouse embryonic stem cell-derived neural crest cells to in vitro assay for developmental toxicology, Mimura, S., Okamoto, T., Furue-Kusuda, M., et al., *Tissue Culture Research Communications*, Vol.30, No.2-4, 159-168, 2011
5. FGFR1 abrogates inhibitory effect of androgen receptor concurrent with induction of androgen-receptor variants in androgen receptor-negative prostate tumor epithelial cells., Kobayashi M, Okamoto, T., McKeehan WL. et al., *Prostate*, Nov;71(15):1691-1700, 2011. 査読有
6. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells., Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. *Int J Dev Biol.* 55(2): 181-187: 2011. 査読有
7. Tissue culture: the unlimited potential., Sato GH, Sato JD, Okamoto T, McKeehan WL, Barnes DW., *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010 Jul;46(7):590-4. Epub 2010 May 29. 査読有
8. Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth

factor-defined serum-free medium. Furue MK, Na J, Okamoto T, Sato JD. et al., *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010 Jul; 46(7):573-6. 査読有

9. Binding of APC and disheveled mediated Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. Matsumoto S, Fumoto K, Okamoto T, Kaibuchi K, Kikuchi A. *EMBO J.* 2010 Apr 7; 29(7): 1192-204.
10. マウス人工多能性幹 (iPS) 細胞の単層無血清培養系の確立、山崎鍋島巧/木村直大/古江美保/岡本哲治、日本口腔組織培養学会誌第20巻第1号39-40頁

[学会発表] (計 14 件)

1. Okamoto, T., Long term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem cells in serum free- and feeder-free growth factor defined culture. Annual Meeting of Association for Dental Science of the Republic of China, Taichung, Aug 27-29, 2011.
2. ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の単層無血清培養系の確立、嶋本顕/木村直大/田原栄俊/岡本哲治、第 48 回日本口腔組織培養学会、日本口腔組織培養学会誌第 21 巻第 1 号 31-32 頁 2011. 11. 19
3. 2011 In Vitro Biology Meeting, Long-term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem(iPS) cells in serum-free and feeder-free defined medium. Sachiko Yamasaki, Miho Furue, J. DenrySato, Tetsuji Okamoto, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal Volume 47, Supplement1, 41-46, June 4-8, 2011. USA
4. 口腔扁平上皮癌における S P 細胞群の癌幹細胞としての分子・生物学的特性の検討 伊藤翼, 藤井良典, 石田康隆, Choon Yee Fan, 岡本哲治 第65回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会 (平成23年4月21日、東京都、タワーホール船堀)
5. 第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の単層無血清培養系の確立、嶋本顕/木村直大/田原栄俊/古江美保/岡本哲治、日本口腔科学会雑誌、巻:61 号:1 頁:119、H23. 4. 21-22, 東京
6. 無血清浮遊培養系を用いたCD133陽性口腔扁平上皮癌細胞のsphere形成能とその癌幹細胞としての細胞・分子生物学的特性の検討、藤井良典, 伊藤翼, 石田康隆, Choon Yee Fan, 岡本哲治、第65回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会 (平成23年4月21日、東京都、タワーホール船堀)
7. Effect of Medium Conditioned by hMSCs on Biological Property of CSCs from OSCC Cell

Lines in Serum-free Culture, Choon Yee Fan, 石田康隆, 藤井良典, 木村直大, 岡本哲治, 第65回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会 (平成23年4月21日、東京都、タワーホール船堀)

8. マウス人工多能性幹(iPS)細胞を用いた頭部神経系の分化誘導、第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会、平成23年4月21日、江戸川区、タワーホール船堀、鍋島巧 山崎佐知子 木村直大 楠田美保 岡本哲治

9. 無血清培養系を用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞株由来CD133陽性細胞群の細胞生物学的特性の検討、藤井良典, 伊藤翼, 石田康隆, 松本真司, Choon Yee Fan, 岡本哲治, 日本口腔組織培養学会学術大会 (平成22年11月13日、高知市、高知県教育会館高知城ホール4F多目的ホール)

10. 無血清培養系を用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞株由来CD133陽性細胞群の細胞・分子生物学的特性の検討、藤井良典, 石田康隆, 松本真司, Choon Yee Fan, 岡本哲治, 第64回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会 (平成22年6月24日、札幌市、札幌プリンスホテル国際館パミール)

11. Effect of Medium Conditioned by hMSCs on growth, motility and sphere formation of SCC cell lines in Serum-free Culture, Choon Yee Fan, 石田康隆, 藤井良典, 岡本哲治, 第64回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会 (平成22年6月24日、札幌市、札幌プリンスホテル国際館パミール)

12. Cellular and molecular characteristics of CD133-positive cells derived from oral squamous cell carcinoma cell line in serum-free defined culture] Fujii Y, Ishida Y, Matsumoto S, Choon Y, Okamoto, T, The International Workshop on BioDental Education and Research2010 (平成22年2月12日、広島市、アステールプラザ広島)

13. マウス人工多能性幹細胞(iPS)細胞の未分化性と多分化能を維持した単層無血清培養系の確立、第64回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会、平成22年6月24日、札幌市、札幌プリンスホテル国際館パミール、鍋島巧 木村直大 楠田美保 岡本哲治

14. 第47回日本口腔組織培養学会、マウス人工多能性幹(iPS)細胞の単層無血清培養系の確立、高知、高知城ホール、山崎佐知子、鍋島巧、木村直大、古江美保、岡本哲治、日本口腔組織培養学会誌第20巻第1号39-40頁, 2010. 11. 13-16

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

1. 発明の名称: Defined Medium for Human ES Cell Culture、

出願人: 岡本哲治、楠田美保、デンリー・サトー、ピーター・アンドリュース、  
出願番号 特願2009-518958  
(P2009-518958),  
国際出願番号: PCT/GB2007/002584

○取得状況 (計4件)

1. 発明の名称: BASAL MEDIUM FOR ES CELL CULTURING,

European Patent No 1,698,690 (Previous Application No 04808168.1),

Proprietor of the Patent: OKAMOTO, Tetsuji, ASASHIMA, Makoto, FURUE, Miho,

ヨーロッパ特許取得日: 2010年4月28日

2. 発明の名称: ES細胞培養用基礎培地、

出願人: 岡本哲治、古江美保、浅島誠、

出願番号: 特願2005-516741、

登録日: 2011年1月7日、

登録番号: 特許第4657108号

3. 発明の名称: アシルスペルミジン誘導体及び抗腫瘍用剤、

出願人: 岡本哲治、小鹿 一、

出願番号: 特願2006-168926、

登録日: 2011年2月25日、

登録番号: 特許第4686722号

4. 発明の名称: Basal Medium for ES culturing,

出願人: Okamoto, Tetsuji, Furue Miho,

Kusuda, Asashima Makoto,

US Patent, No. 7,923,245,

特許登録日: 2011年4月12日、

米国出願番号: 10/584,371,

国際出願番号: PCT/JP04/19818 .

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 哲治 ( OKAMOTO TETSUJI )

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00169153

(2) 研究分担者

福井 康人 ( FUKUI YASUTO )

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 90363085

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

