

## 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 5 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792016

研究課題名（和文） iPS 細胞を用いた口腔癌免疫療法の基盤技術開発

研究課題名（英文） Development of basic technology using iPS cells for immunotherapy of oral cancer

## 研究代表者

佐藤 華 (Sato Hana)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50551222

研究成果の概要（和文）：iPS 細胞(induced pluripotent stem cells)は体細胞に数種類の遺伝子を導入することによって ES 細胞(embryonic stem cells)に似た分化万能性を持たせた細胞である。本研究の目的は、口腔癌の新しい治療方法として、iPS 細胞を用いた免疫療法を実現するための基盤技術を確立することである。我々は、京都大学において樹立されたマウスの iPS 細胞を入手し、口腔癌の骨転移に極めて深く関与することが知られているミエロイド系樹状細胞と破骨細胞への分化誘導条件の確立を試みた。まず、これらの細胞の分化誘導を支持する可能性をもつ種々の骨芽細胞様の細胞株と iPS 細胞を共存培養し、そこに様々な分化誘導因子候補物質を添加した。骨芽細胞株と iPS 細胞を共存培養する際の細胞数や処理する分化誘導候補因子の濃度、細胞の培養時間など、様々な条件について検討した結果、骨芽細胞株 UAMS-32 の存在下において樹状細胞と推察される高い貪食能をもつ細胞の分化誘導に成功した。さらに培養日数を延長することによって、破骨細胞と同様に骨吸収能を有する多核巨細胞の誘導に成功した。これらの細胞の分化誘導効率は支持細胞である骨芽細胞株の種類によって大きく変化した。以上の結果は、iPS 細胞から誘導した樹状細胞を癌の免疫療法に用いることができる可能性と、iPS 細胞から破骨細胞の分化誘導過程を阻害する物質を開発することにより、口腔癌の免疫療法の改良や癌の骨転移抑制に役立つ可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）： iPS (induced pluripotent stem) cells are multipotent cells induced from somatic cells by transfection of 4 genes. In this study, we tried to establish a basic technology using iPS cells useful for development of new immunotherapy of oral cancer. Mouse iPS cells obtained from Kyoto University were subjected to induce myeloid dendritic cell and osteoclast differentiations, which are known to relate to bone metastasis of oral cancer. iPS cells were cocultured with some osteoblastic cell lines in the presence of various kinds of differentiation factors. The coculture conditions such as, cell numbers in culture wells, concentrations of differentiation factors, and incubating periods were examined. We found that osteoblastic UAMS-32 cell line supports the differentiation of dendritic cell-like cells with phagocytic potential. Furthermore, elongation of the coculture periods induced differentiation of osteoclast-like multinucleated giant cells with bone resorbing capacity. Differentiation efficiency of dendritic cells and osteoclasts depended on cell types of osteoblastic cell lines. These results suggest a possibility to use iPS cells-derived dendritic cells in immunotherapy of oral cancer. In addition, development of new drugs that inhibit osteoclast differentiation from iPS cells would be useful to improve immunotherapy and suppression of bone metastasis of oral cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：iPS細胞，口腔癌，免疫療法，樹状細胞，破骨細胞，遺伝子，細胞分化

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞は2006年に京都大学の山中伸弥教授らが樹立した人工多能性幹細胞であり、再生医療のほか、難病の病因・発症メカニズムの解明に役立つと期待されている。しかしながら、iPS細胞を医療に応用するにはまだ課題が山積しており、特にiPS細胞から必要とする細胞や組織・器官を人工的に誘導する方法を開発することがその実現へむけての第一歩となりうる。そのため、世界中で多くの研究者が種々の細胞や組織の誘導方法の開発に取り組んでいる。

口腔癌の治療では、外科的切除、放射線療法および化学療法では良好な結果が得られない場合の1つの手段として、患者自身の免疫力によって癌を抑制する方法がある。免疫療法と呼ばれるこの方法は癌細胞を樹状細胞やマクロファージなどのAPC (Antigen presenting cell:抗原提示細胞) に癌細胞を認識させ、その活動を抑制するものであり、すでに癌の抑制や延命効果が報告されている。しかし、患者からのAPCの採取量には限りがある。

iPS細胞からAPCを誘導できれば、免疫療法の長期的治療が可能となると期待される。しかし、そのような方法はまだ確立されておらず、iPS細胞をどのような条件で培養

すれば効率的にAPCを誘導できるのか、またそれらがどの程度の癌抑制能力を持つのか不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、iPS細胞から樹状細胞や破骨細胞の分化を誘導する方法を開発し、口腔癌の新しい治療方法として、iPS細胞を用いた免疫療法を実現するための基盤技術を確立することである。

3. 研究の方法

iPS細胞の分化には、支持細胞の選択が重要であるため、種々の支持細胞を用いてAPCへの分化誘導に適した支持細胞を検討した。APCであるマクロファージは樹状細胞へと分化することが知られているため、iPS細胞に種々の分化誘導因子を添加し、マクロファージを分化させ、さらに樹状細胞分化誘導因子を加え、樹状細胞へ分化するかどうか検討した。また、分化過程における遺伝子発現の変化についても解析を行った。

さらに、口腔癌の骨浸潤に深く関与すると言われる破骨細胞の分化誘導について、様々な種類の骨芽細胞株と共存培養し、種々の分化誘導因子を添加することによって分化誘導効率を検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 樹状細胞の分化誘導

iPS 細胞を様々な骨芽細胞株と共存培養したところ、UAMS-32 細胞株を用いた時に、高い貪食活性を有する細胞の形成が認められた。この細胞は、培養 1 週間～2 週間の間に出現し、蛍光標識した酵母粒子を培養系に添加すると、それを 30 分以内に細胞内に取り込んだ (図 1)。このことは、iPS 細胞がマクロファージや樹状細胞様の細胞に分化したことを示唆する。

他の細胞株 (RD-c6, ST2) や、頭蓋骨から採取した骨芽細胞を用いた場合もこのような貪食性の細胞形成が認められることもあった。しかし、それは UAMS-32 細胞を共存培養に用いた時よりも再現性が低く、安定した分化誘導のためには UAMS-32 細胞が最も適していた。

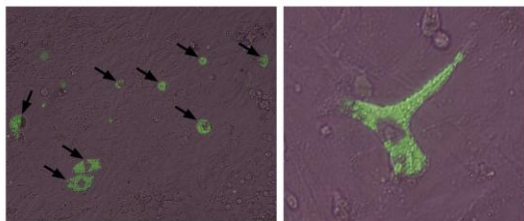


図 1 iPS 細胞から誘導した樹状細胞様細胞

##### 2) 破骨細胞の分化誘導

iPS 細胞を様々な骨芽細胞株と共存培養したところ、UAMS-32 細胞株に破骨細胞形成支持能を見いだした。これらの細胞は破骨細胞の分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを産生しており、融合し、多核巨細胞を形成した (図 2)。

さらに、様々な分化誘導因子を添加して破骨細胞形成を検討したところ、10～100 nM のデキサメタゾンと 10～100 nM の活性型ビタミン D の存在下において最も効率的に破骨細胞の形成が誘導された (図 3)。

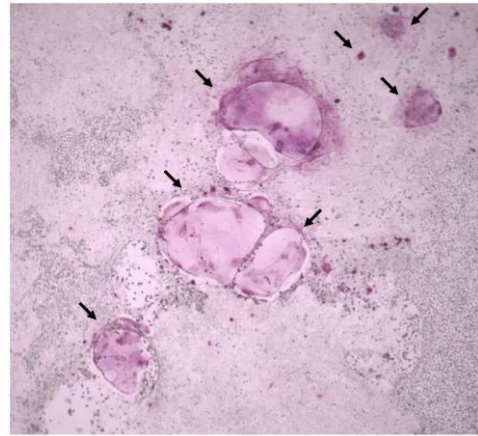


図 2 iPS 細胞から誘導した破骨細胞

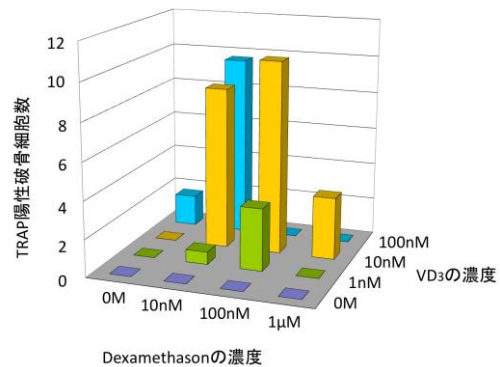


図 3 デキサメタゾンと活性型ビタミン D が破骨細胞分化に与える影響

また、樹状細胞の場合と同様に、各種骨芽細胞株の破骨細胞形成支持活性を比較したところ、UAMS-32 細胞のみ破骨細胞分化を支持することがわかった。さらに、培養初期の iPS 細胞の播種密度によって破骨細胞誘導効率が大きく変化することが明らかとなった (図 4)。

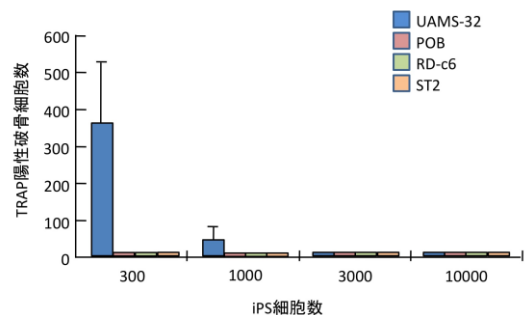


図 4 骨芽細胞株の種類と iPS 細胞数が破骨細胞形成に与える影響

以上の結果は、UAMS-32 細胞を用いることによって、iPS 細胞から樹状細胞の分化を誘

導できること、さらに、デキサメタゾンと活性化型ビタミンDを添加することで、破骨細胞の分化誘導も可能であることを示唆する。

我々の研究成果は、今後 iPS 細胞から樹状細胞を分化誘導して口腔癌の免疫療法に応用するときや、iPS 細胞から破骨細胞分化を誘導するときに基礎的な知見として極めて重要であり、将来の口腔癌の治療および骨浸潤のメカニズム解明に役立つことが期待される。

#### 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 1 件)

- ① Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, Tsukasaki H, Inoue T, Shintani S, Koike T, Honda Y, Suzuki O, Baba K, Kamijo R. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor. Tissue Engineering; Part A Nov 9. 2010.

[学会発表] (計 0 件)

[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

<http://www.omfs-showa.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 華 (Sato Hana)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50551222