

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861945

研究課題名(和文)無血清胚様体培養系を用いた顎顔面遺伝性疾患由来ヒトiPS細胞の分化能解析

研究課題名(英文) Differentiation potency analysis of maxillofacial genetic disease derived iPS cells by serum-free embryoid culture

研究代表者

鍋島 巧 (Nabeshima, Kou)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：10550999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：健康人由来iPS細胞および鎖骨頭蓋異形成症CCD由来iPS細胞から、アクチビンAを用いて、集合胚葉体と呼ばれる細胞塊を作成した。この集合胚葉体を30日間の長期に培養を行い、誘導された組織について分析を行った。培養された集合体の組織切片を作成し、組織学的に検討したところ、明らかな軟骨組織の組織形態は認められなかった。しかしながら、組織切片の染色や組織の遺伝子解析により、誘導された集合体が、顎顔面領域の軟骨組織であることが示唆された。

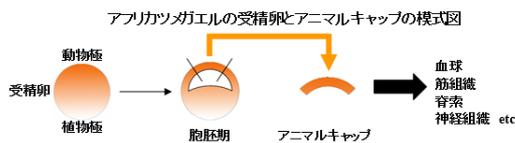
研究成果の概要(英文)：Healthy subject and cleidocranial dysplasia derived iPS cells was generated the cell mass called the embryoid body using activin A. This embryoid body was cultured for a long term of 30 days and analyzed it about the induced organization. Tissue section prepared cultured embryoid body, which has examined histologically, not showed clear cartilaginous tissue. However, tissue section staining and genetic analysis suggested that induced embryoid body have been cartilaginous tissue of maxillofacial region.

研究分野：口腔外科

キーワード：iPS細胞 再生医療

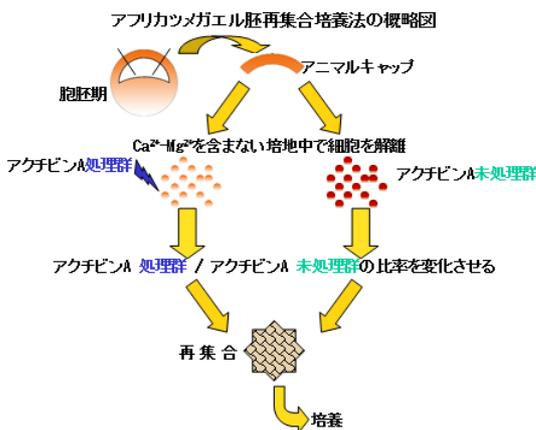
1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエルの卵は、受精後卵割を繰り返す、胞胚期と呼ばれる段階まで発生が進むと、胚の動物極側内部に、胞胚腔と呼ばれる空洞が形成される。この胞胚腔の上方の細胞層がアニマルキャップと呼ばれている部分である。アニマルキャップは未分化幹細胞群であり、中胚葉誘導因子として知られているアクチビン A を用いたアニマルキャップアッセイにより、アニマルキャップ細胞から、血球・体腔上皮・筋組織・脊索といった中胚葉組織のみならず、神経組織等の外胚葉組織や腸管等の内胚葉組織を誘導できる事が報告されている (Ariizumi and Asashima, Development, growth & differentiation, 1994)。



また、アニマルキャップとアクチビン A を用いたサンドイッチ培養法で、顎顔面領域の位置情報を持つ軟骨組織が誘導可能である事が報告されている (Furue M. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002)。

さらに、アクチビン A 処理したアニマルキャップと、アクチビン A 未処理のアニマルキャップを混合して再集合体と呼ばれる細胞塊を作成し培養する再集合培養法を行うと、非常に効率良く顎顔面領域の位置情報を有する軟骨組織が誘導される事も報告されている (Myoishi Y. et al, Int. J. Devel. Biol., 2004)。



一方、哺乳類の iPS 細胞は、アニマルキャップと同様に、あらゆる細胞に分化する多分化能を有する幹細胞である。ヒト iPS 細胞からは、これまでに、軟骨組織はもとより、様々な組織の誘導が可能となっているが、顎顔面領域などの位置情報を有した軟骨組織を誘導したという報告はない。

先に述べたアフリカツメガエル胚再集合培養系は位置情報を有する組織を誘導可能であり、同培養法は技術的にヒト iPS 細胞にも応用可能であると考えられる。また、近年、様々な疾患特異的ヒト iPS 細胞が樹立されており、疾患の発症メカニズムの解明や、診断・治療法の開発に用いられている。

これまでに、顎顔面領域に病変を有する疾患の iPS 細胞樹立の報告は無かったが、研究代表者の所属する研究室では、鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) 患者由来の iPS 細胞の樹立に成功している。この患者由来 iPS 細胞は、フィーダー細胞を用いない無血清条件下にて樹立されており、異種動物等の細胞由来蛋白・未知のウイルスなどの影響が排除でき、また、意図しない増殖・分化因子の影響を取り除く事ができるため、目的とする因子の検討が標準化できる。

CCD は Runx2 の変異により発症する疾患であり、顎顔面領域を含めた骨・軟骨分化に異常をきたす疾患である。この CCD 由来 iPS 細胞から、顎顔面領域の位置情報を有した組織を誘導し、健常人由来ヒト iPS 細胞から誘導された組織と比較検討すれば、詳細な病態・発症機序の解明が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

無血清培養系で未分化性と多分化能を継代維持されている健常人由来ヒト iPS 細胞、および CCD 由来 iPS 細胞を用いて、顎顔面領域の位置情報を持った組織の誘導法を確立する。

アフリカツメガエル胚の再集合培養法では、アニマルキャップ未分化幹細胞群から顎顔面領域の位置情報をもった軟骨組織を誘導できる。このアニマルキャップ細胞群を同様の未分化幹細胞であるヒト iPS 細胞におきかえ、顎顔面領域の位置情報を持った軟骨組織が誘導できるかを検討する。健常人由来ヒト iPS 細胞から誘導した組織を組織学的、及び免疫組織化学的に検討し、軟骨組織が誘導されるかどうか確認する。また、誘導した組織から RNA を抽出し、軟骨細胞誘導に関わる遺伝子や、顎顔面領域の位置情報に関わる遺伝子が発現しているかどうか検討する。一方で、健常人由来ヒト iPS 細胞から顎顔面領域の位置情報をもった軟骨組織を誘導できる条件にて、CCD 由来 iPS 細胞、及びミスセンス変異部位の配列を人工ヌクレアーゼ (ZFN, TALEN) を用いて正常化した CCD 由来 iPS 細胞から組織を誘導し、健常人由来ヒト iPS 細胞から誘導された組織と比較検討する。

iPS 細胞や胚性幹 (ES) 細胞は、従来フィーダー細胞と血清を用いて培養される必要があったが、研究代表者の所属する研究室では、フィーダー細胞と血清を用いない無血清培養系を確立した (Furue M. et al, In vitro cellular & developmental biology. Animal.

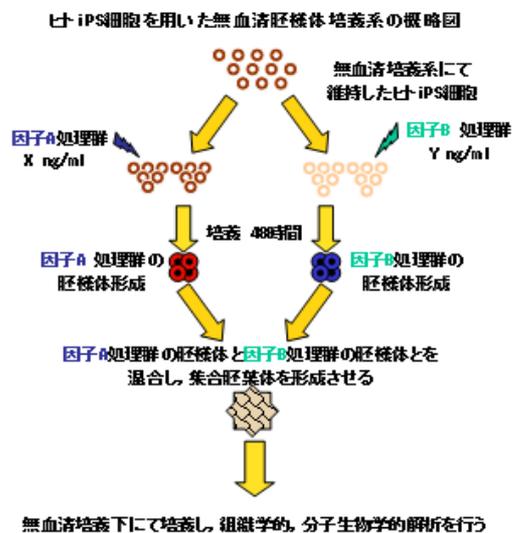
2005)。臨床応用するうえで、血清中の未知蛋白や増殖因子・誘導因子等の影響を排除する事ができる無血清下での培養は重要であると考えられる。本研究により、顎顔面領域の位置情報を有した組織誘導法を確立すれば新たな組織発生研究及び再生医療への応用につながると思われる。

### 3. 研究の方法

本研究は全て無血清培養系で行った。通常血清入り培地を用いた場合、血清中に含まれる未知のケモカイン及び細胞増殖因子や誘導因子等の液性因子や、蛋白、脂質等の影響により、組織の誘導条件を正確に把握する事が困難である。無血清培養系を用いる事で、未知の蛋白等にさらされる危険を排除する事ができ、臨床応用する上では重要であると考えられる。研究代表者の所属する研究室では、正常上皮細胞、骨髄幹細胞、ES細胞及びiPS細胞の無血清培養系をすでに確立し(Furue M. et al, *In vitro cellular & developmental biology. Animal.* 2005), 特許も取得している(BASAL MEDIUM FOR ES CELL CULTURING, 特許番号 EP1698690)。

再集合培養法を応用したヒト iPS 細胞からの軟骨組織誘導について誘導方法の条件検討を行った。

まず、健康人由来 iPS 細胞を 2 群に分けて、浮遊培養用プレートに播種する。アフリカツメガエル胚再集合培養法と同様に、一方の群にはアクチビン A を添加し(アクチビン A 処理群), 48 時間培養を行い胚様体を形成させた。もう一方の群にはアクチビン A を添加せず(アクチビン A 未処理群), 同様に 48 時間培養を行い、胚様体を形成させた。続いて、アクチビン A 処理群とアクチビン A 未処理群の胚様体を 1 つの well に混合して培養し、両群の胚様体が一塊となった集合胚葉体を形成させた。この集合胚葉体を 30 日間の長期に培養を行い、誘導された組織について分析を行った。



アフリカツメガエル胚再集合培養法では、アクチビン A 処理群とアクチビン A 未処理群の混合比率を変化させるだけで、様々な組織を誘導できる(Myoishi Y. et al, *Int. J. Devel. Biol.*, 2004)。この点を踏まえ、アクチビン A 処理群とアクチビン A 未処理群の混合比率を、1:1 だけではなく、1:3 や 1:5 など別の比率で集合胚葉体を作成した。また、混合比率だけでなく、処理する因子として、アクチビン A 以外の因子を用いた検討も行った。処理因子の候補としては、個体発生初期に体軸の決定や臓器の形態形成に対して様々な働きを持つと言われている TGF-スーパーファミリ(BMP, Nodal(Zhou et al., 1993; Mishina et al., 1995; Winnier et al., 1995; Schier and Shen, 2000; Hamada et al., 2002))を適用した。

培養された集合体が軟骨組織である事の確認は、組織切片を作成して組織学的に検討した。

さらに、PAS 染色, type コラーゲンによる免疫組織化学染色によっても検討した。培養された集合胚葉体が顎顔面領域の位置情報を有しているかについては、集合胚葉体から RNA を抽出し、顎顔面領域に関わる、頭部・顎軟骨・眼・咽頭や神経堤のマーカー遺伝子群である Col2, Sox9, gsc, Otx2, AP2 並びに Pax6 発現の有無を検討した。

### 4. 研究成果

健康人由来 iPS 細胞および CCD 由来 iPS 細胞を 2 群に分けて、アクチビン A 処理群とアクチビン A 未処理群の混合比率を、1:1, 1:3 及び 1:5 の比率で集合胚葉体を作成した。この集合胚葉体を 30 日間の長期に培養を行い、誘導された組織について分析を行った。

培養された集合体の組織切片を作成し、組織学的に検討したところ、明らかな軟骨組織の組織形態は認められなかった。しかしながら、組織切片を PAS 染色, type コラーゲンによる免疫組織化学染色を行ったところ、両方ともに陽性を認めた。また、PAS 染色, type コラーゲンによる免疫組織化学染色にて陽性を認めた集合胚様体から RNA を抽出し、顎顔面領域に関わる、頭部・顎軟骨・眼・咽頭や神経堤のマーカー遺伝子群である Col2, Sox9, gsc, Otx2, AP2 並びに Pax6 発現の有無を検討したところ、Otx2, AP2 の発現を認めた。

### 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 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鍋島 巧 (NABESHIMA KOU)  
広島大学病院 歯科診療医  
研究者番号：10550999