

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463029

研究課題名(和文)凍結切片によるiPS細胞の分化誘導メカニズムの解明とその品質評価法確立への応用

研究課題名(英文)A new induction method for the controlled differentiation of human iPS cells using frozen sections

研究代表者

下間 雅史(Simozuma, Masashi)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：50612008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞を効率的に分化誘導し、さらに品質評価するための新たな手法として、われわれは凍結切片を利用する新たな分化誘導法を確立しそのメカニズムを解明することを目的に検討を行った。そこで、マウスの肝臓、脳、脊髄の凍結切片を作製し、その切片上、固定処理した切片上、マウスの各組織より抽出したmicroRNAを培養液に添加の3群でヒトiPS細胞を培養したところ、凍結切片上で培養したiPS細胞では、分化誘導が可能であり、また固定した凍結切片上培養では分化誘導効率は低下した。このことから、タンパク質成分および固定された凍結切片に残存する何らかの微小構造や微小環境が分化誘導に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that it is possible to induce the controlled differentiation of iPSCs by using frozen sections of tissues/organs which are targets for regeneration. First, we cultured iPSCs on frozen sections of liver, brain and spinal cord. As a result, iPSCs on liver sections dominantly expressed hepatocytic markers and that iPSCs on brain/spinal cord sections dominantly expressed neural markers. Importantly, some other iPSCs generated from other type of cells also denoted the same tendency when they were cultured on frozen sections. More interestingly, the efficacy of induced differentiation of iPSCs on the frozen sections was noted to be significantly different among clones of iPSCs. Judging from these facts, the induction method for the controlled differentiation of human iPS cells using frozen sections reported in the present study could be useful as a simple and effective measures for inducing the differentiation of iPSCs and evaluating the quality of iPSCs.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 iPS細胞 分化誘導 品質評価

1. 研究開始当初の背景

種々の疾患や外傷により本来の機能や形態が失われた組織や臓器に対して、現在行われている生体臓器移植や人工臓器移植などの先端医療には、それぞれ拒絶反応や、耐久性・機械的強度などの様々な問題点や限界がある。このことから近年、幹細胞を用いた再生医療の果たす役割は大きくなってきており、再生医学は現在最も臨床応用が期待されている研究分野の一つである。この再生医療を実現するためには、安定した幹細胞の供給源を確保することが極めて重要であり、現在のところ ES 細胞や成体幹細胞、あるいは iPS 細胞が細胞の供給源として考えられている。候補となる幹細胞にはそれぞれ利点、欠点があるが、なかでも ES 細胞に匹敵する多能性を持ちながらも倫理的、社会的問題が少ない iPS 細胞には大きな期待が寄せられている。

iPS 細胞を再生医療に応用するには解決すべき問題があり、これらは iPS 細胞の特異的性質に起因している。その問題としては、安全・確実・簡便・安価な分化誘導法の確立、iPS 細胞の品質評価法の確立、および目的とする機能細胞への分化に適した iPS 細胞クローンの選別法の確立である。現在報告されている分化誘導法は種々の増殖・分化因子を組み合わせるものであるが、添加因子の理想的組合せの決定はきわめて難しく、また経済的、時間的負担が大きい。また、iPS 細胞は由来細胞の遺伝的背景や作製方法、培養条件によりその性質に差があること、同じ組織より採取した細胞から作製した iPS 細胞でも分化能に差があること、シングルコロニーから分離した iPS 細胞でも増殖の過程で各クローン間に分化誘導に対する反応性に差が生じること、さらにはコロニー中心部と辺縁部の細胞でもその性質に差があることが明らかになってきているが、未だこれらを正確に評価する方法も確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

そこで研究代表者らは、これまでに、これらの課題を克服することを目的に、分化誘導環境を実際に再生を目指す組織・臓器自体に求めることで分化誘導が

可能ではないかという仮説の下、目的臓器の凍結切片上で iPS 細胞を培養し分化を誘導するという簡便で安価なまったく新しい分化誘導法の確立を試みた。用いた iPS 細胞は、歯科分野において比較的簡単に採取可能である口腔粘膜由来細胞から樹立した iPS 細胞である。その結果、肝臓凍結切片上で培養した iPS 細胞が、高率に肝細胞へ分化誘導されることを見出した。さらに、脳および脊髄凍結切片上で培養した iPS 細胞では、神経系細胞への分化が高率に誘導されることを確認した。各種増殖・分化因子を添加する従来の培養に依存しない新たな視点に立った簡便な分化誘導法の確立に成功したものである。この研究成果を踏まえ、本研究では、本誘導法が他の異なる体細胞由来 iPS 細胞や、樹立方法の違う iPS 細胞に対しても普遍的に応用可能であるかどうかにつき検討するとともに、この分化誘導現象につき、培養上清中に遊離される各種因子や、細胞の接着する足場としての微小環境、さらには凍結組織切片が放出する microRNA などに着目することにより、分化誘導環境の詳細な解析を行い、そのメカニズムを解明するとともに、分化誘導刺激に対する反応性の差に基づいた iPS 細胞クローンの選別および品質評価が可能かどうかについて検討した。

3. 研究の方法

雄性 6 週齢 ICR マウスの肝臓、脳、脊髄の凍結切片上にて由来組織および樹立方法の異なる 4 種のヒト体細胞由来 iPS 細胞を播種し、9 日間培養し分化誘導を行った。この細胞から RNA を回収し RT-PCR 法にて肝細胞、神経系細胞に発現される特異的マーカー分子の遺伝子発現を検討するとともに、免疫細胞化学的手法によりその発現を確認し、陽性細胞数を統計学的に評価した。

さらに、凍結切片をアセトンで固定し、洗浄によりアセトン除去した後、iPS 細胞を培養した群および、凍結切片作成用組織からの miRNA 抽出液を培養液中に添加した群とで、その分化誘導効率を比較検討し、iPS 細胞の凍結切片上分化誘導のメカニズムについても検討した。

4. 研究成果

用いた iPS 細胞は以下の 4 種類であった。

	hOF-iPS	HPS77	HPS63	HPS76
origin	oral mucosa	dental pulp	skin	skin
gene expression vector	retrovirus vector	episomal vector	retrovirus vector	episomal vector
foreign genes	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53 shRNA	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53 shRNA

凍結切片上での iPS 細胞の培養方法として、各組織の凍結切片を培養ガラス上に載せ、そこに iPS 細胞の懸濁液を播種、細胞が切片上に付着するのを待ち、培養液を添加して、一定の期間培養した。

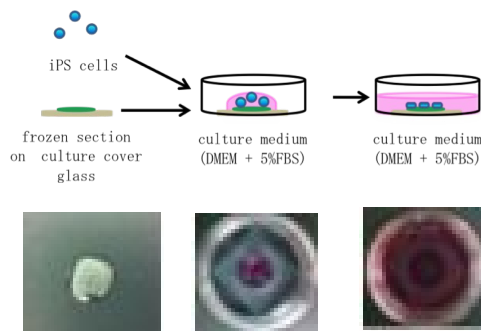


図 1：凍結切片上での iPS 細胞の培養方法の模式図

その結果、細胞形態の変化が認められ、コントロール群では拡がった iPS 細胞が、様々な形態を呈し統一性が認められないのに対し、肝臓群では比較的大型で多角形の形態を呈する細胞が認められ、脳群、脊髄群では複数の細長い突起を有する神経細胞様形態を呈する細胞を多数認めた。

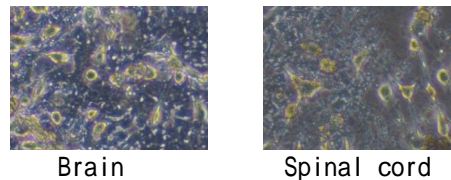
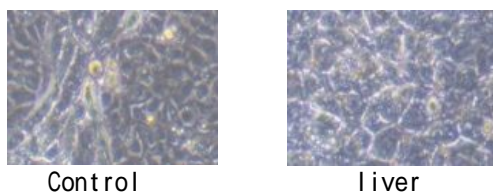


図 2：培養中 iPS 細胞の位相差顕微鏡像

凍結切片上で培養した iPS 細胞それぞれの RNA 発現について解析したところ、コントロール群では未分化マーカーといくつかの肝細胞、神経細胞マーカーの発現が認められた。肝臓群では未分化細胞マーカーは消失し、神経系細胞への分化が抑制され、肝細胞への分化が維持されていた。脳群、脊髄群では、幹細胞の場合と同様未分化マーカーの発現が消失し、肝細胞群とは逆に肝細胞への分化が抑制され、神経系細胞への分化が維持されていた。

さらにタンパク質発現について解析したところ、肝細胞のマーカーである AFP/AAT 陽性細胞は、control 群では一部の細胞に発現が認められるのみであるのに対し、肝臓群ではより多くの陽性細胞が認められ、脳群・脊髄群ではほとんど陽性細胞を認めなかった。神経系細胞マーカーである GFAP/CNPase 陽性細胞は、control 群・肝臓群ではほとんど認められないのに対し、脳・脊髄群ではより多くの陽性細胞が認められた。全有核細胞数に対する陽性細胞数を測定することにより分化誘導効率の差を評価した。AFP/AAT 陽性細胞の割合はコントロール群と脳・脊髄群に比較して肝臓群で有意に高い傾向を示した。また、コントロール群、肝臓群と比較して脳・脊髄群では、GFAP 陽性細胞の割合が有意に高い傾向を認めた。

また、4つの iPS 細胞株において、それぞれの細胞株の違いによって凍結切片上誘導に問題がないか（普遍的にいずれの iPS 細胞にも本方法が分化誘導法として適用可能かどうか）また、各 iPS 細胞間で誘導効率の差があるかどうかについて、特異的マーカータンパク質の陽性細胞率により検討したところ、すべての iPS 細胞株において、肝臓群では肝細胞マーカーの陽性細胞率が有意に高く、また、脳群、脊髄群では神経系細胞マーカーの陽性細胞率が有意に高かった。また、それぞれの iPS 細胞株において、肝細胞または神経系細胞マーカーの陽性細胞率に差を認めた。このことから、凍結切片上で培養するという本方法は iPS 細胞の簡便な分化誘導法として応用できるのみでなく、本誘導法によって対象となるそれぞれの iPS 細胞の未分化状態の評価や分化誘導刺激に対する反応性の差を評価するのに有用であるとも考えら

れた。

さらに、この誘導法のメカニズムについて検討するために、凍結切片をアセトン固定し、この切片上で iPS 細胞を培養したところ、前項と同様に分化誘導は可能ではあるが、誘導効率に一定の低下が認められた。このことから、凍結切片に含まれるタンパク質成分が iPS 細胞の分化誘導に重要な役割を担うとともに、タンパク質要素の排除された凍結切片における微細構造や微小環境などが、再生を目指す目的組織・臓器に類似している点が、分化誘導に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

加えて、メカニズムの検討として、凍結切片作成用臓器より miRNA を抽出し、これを培養液に添加して iPS 細胞を培養したところ、何も添加していないコントロール群と比較して分化誘導に明らかな差は認められなかった。今回は miRNA の大きさの限定が出来ず、コレクションにまだまだ改善の余地があるため、現時点では miRNA に関しては分化誘導に關与しているかどうかの明言は出来ないが、今後さらに検討を加えて miRNA の關与についても明らかにし、本法を簡便かつ安価な分化誘導法として応用するとともに、iPS 細胞の品質評価法として応用することを目標に検討を進めていく予定である。

		hOF-iPS	HPS77	HPS63	HPS76
AFP	Control	4.03%	13.82%	17.59%	10.53%
	Liver	31.88%	42.01%	42.67%	34.35%
	Brain	4.15%	3.31%	5.65%	6.07%
	Spinal cord	3.70%	6.80%	7.07%	6.25%
AAT	Control	4.19%	2.51%	4.72%	4.09%
	Liver	36.19%	27.82%	42.20%	27.07%
	Brain	4.24%	5.17%	5.25%	6.47%
	Spinal cord	5.80%	2.69%	4.32%	4.22%
GFAP	Control	8.57%	4.00%	4.48%	3.34%
	Liver	2.39%	3.03%	2.57%	3.99%
	Brain	51.64%	51.30%	47.23%	55.51%
	Spinal cord	39.57%	51.01%	29.83%	37.75%
CNPase	Control	8.59%	2.89%	9.25%	3.10%
	Liver	5.37%	1.62%	2.51%	2.89%
	Brain	67.66%	51.63%	46.02%	54.39%
	Spinal cord	64.39%	42.72%	32.18%	39.95%

表 1：4 つの iPS 細胞株における分化誘導効率の差

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)

[学会発表](計 5 件)

田所 晋、戸田(徳山)麗子、館原誠晃、井出信次、梅木泰親、里村一人 凍結切片を利用した iPS 細胞の分化弓道法における k 誘導因子の解析 第 61 回日本口腔外科学会総会学術大会 2016.11.25-27 幕張メッセ (千葉県千葉市)

田所 晋、戸田(徳山)麗子、館原誠晃、井出信次、里村一人 凍結切片を用いた iPS 細胞の新規分化誘導法の確立と品質評価法への応用 第 23 回日本歯科医学会総会 2016.10.21-23 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

田所 晋、戸田(徳山)麗子、他 凍結切片を用いた iPS 細胞の新たな分化誘導法の確立とメカニズムの検討 第 60 回日本口腔外科学会総会学術大会 2015.10.16-18 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Tadokoro S, Tokuyama R, Tatehara S, et al. A new induction method for the controlled differentiation of human iPS cells using frozen section. 12th International society for stem cell research annual meeting 2014.06.18-21 Vancouver Convention Center (カナダバンクーバー)

田所 晋、徳山麗子、館原誠晃、井出信次、梅木泰親、福島龍洋、下間雅史、他 凍結切片を用いた iPS 細胞の新たな分化誘導法および品質評価法の確立 第 14 回抗加齢医学会総会学術大会 2014.06.06-08 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下間 雅史 (SHIMOZUMA, Masashi)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：50612008

(2) 研究分担者

里村 一人 (SATOMURA, Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

館原 誠晃 (TATEHARA, Seiko)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90380089

徳山 麗子 (TOKUYAMA, Reiko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20380090

井出 信次 (IDE, Shinji)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号： 00611998