

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861723

研究課題名(和文) 遺伝性顎口腔疾患特異的iPS細胞を用いた無血清培養系における発症機序解明

研究課題名(英文) Generation and analysis of oral and maxillofacial disease-specific human iPSCs in completely serum-, feeder-, and integration-free culture

研究代表者

山崎 佐知子 (Yamasaki, Sachiko)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：00632001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてヒト幹細胞の未分化性と多分化能を維持可能なフィーダーレス完全無血清培地を開発し、センダイウイルスSeVdpを用い、ウイルスインテグレーションフリー培養系にてヒトiPS細胞の樹立・維持に成功した。本成果をもとに口腔顎顔面領域に異常をきたす各種遺伝子疾患特異的ヒトiPS細胞を樹立し、疾患モデルを作成した。なかでも、鎖骨頭蓋異形成症患者由来ヒトiPS細胞を用い、ゲノム編集技術にて得られた遺伝子変異の正常化株を用いて機能解析を行い発症メカニズムの解明や医療分野への応用を目指した。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells hold great promise for their practical and scientific potentials. To improve understanding of self-renewal and differentiation, we could generate and maintain human iPSCs in serum- and feeder-free culture conditions using retroviral vectors. To avoid the unpredictable side effects associated with retrovirus integration, we generated hiPSCs from dental pulp cells and PBMCs with a non-integrating replication-defective and persistent Sendai virus (SeVdp) vector. Using this system, pluripotent and self-renewing hiPSCs could be easily and stably generated and propagated. With this system we established hiPSCs from cleidocranial dysplasia (CCD) caused by a mutation of RUNX2, which has an important role in the differentiation of osteoblasts and maturation of chondrocytes. The cartilage in the teratomas of CCD-iPSCs showed abnormalities. These CCD-iPSCs would be beneficial to clarify the molecular mechanism and for development of medical applications.

研究分野：外科系歯学

キーワード：歯学 再生医学 幹細胞 遺伝子疾患

### 1. 研究開始当初の背景

これまでにヒト幹細胞 (ES/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ることが多く、不安定要素や異種抗原、未知の感染性因子の混入等の問題もあるため、細胞増殖・分化制御機構やその制御因子を比較検討することは非常に困難であった。このような培養条件下で培養されたヒト幹細胞では、増殖因子・分化誘導因子の機能を比較することが困難であり、臨床応用の面では安全性が問題となる。そこで、組成の明らかな培養条件の確立および安全性の向上のため、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を用いて、ヒト iPS 細胞の樹立し、それら細胞を用いて機能解析を試みた。

### 2. 研究の目的

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養条件を用いて、フィーダー細胞を使用せずヒト iPS 細胞の誘導および維持を試みるとともに、発症メカニズムの解明や診断・治療法が十分に確立されていない顎顔面口腔領域の遺伝性疾患患者よりヒト iPS 細胞を誘導し、同疾患特異的 iPS 細胞を用いてその詳細な発症メカニズムの解明および診断・治療法の開発を行うことを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) センダイウイルス SeVdp を用いた無血清培養法の確立：

ヒトゲノム DNA への遺伝子挿入がなく (integration-free)、ウイルスの確実除去が可能なセンダイウイルスベクター-SeVdp を用い、フィーダー細胞を用いず無血清培養条件下にてヒト iPS 細胞の誘導および維持可能な方法について検討し、安全で高品質な iPS 細胞の誘導を行った。

(2) 鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) iPS 細胞を用いた発症メカニズムおよび原因究明：

CCD 患者由来 iPS 細胞を用いて人工ヌクレアーゼ (TALEN, ZFN, CRISPER) を使用しゲノム編集を行うことで、発症メカニズムの解明ならびに詳細な機能解析を行った。CCD は Runx2 の変異により発症する常染色体優性遺伝であり、顎顔面口腔領域を含めた骨・軟骨分化に異常を認める疾患である。樹立した CCD 患者由来 iPS 細胞に対して、遺伝子変異部位のゲノム編集を人工ヌクレアーゼを用いて行い、ミスセンス変異部位の配列を正常化し、分化誘導時の特性解析について正常人由来 iPS 細胞との比較検討を目指した。また、本疾患の原因遺伝子産物 Runx2 は軟骨細胞分化、破骨細胞分化、歯の発生に重要な因子であるため、骨・軟骨細胞系列への分化誘導を行い、健常人由来 iPS 細胞と比較検討を行うことで、発症メカニズムの解明ならびに詳細な機能解析を目指した。

(3) 各種疾患特異的 iPS 細胞の樹立および幹細胞バンク化：

他にも顎口腔顔面領域に異常をきたす各種遺伝子疾患患者由来 iPS 細胞を樹立し、同様の検討を行った。また樹立した各種疾患特異的 iPS 細胞は GMP に準拠した細胞培養センター (CPC) と自動細胞凍結保存システム等を利用して疾患特異的 iPS 細胞の供給、再生医療分野での製品化を含め、最終的に臨床応用を目指した。

### 4. 研究成果

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) を基本培地として、フィーダー細胞および血清成分を使用せず、我々の開発した無血清培地 (hESF9) を用いて、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養系を確立した (Yamasaki S. et al. PLoSOne 2014)。さらに、同培養系を用いて、ゲノム DNA への遺伝子挿入がなく、ウイルスの確実除去が可能なセンダイウイルスベクター (SeVdp (KOSM)、SeVdp (KOSM)302L) を使用し、完全無血清培養系にてヒト iPS 細胞の誘導が可能となった。また同ベクターは初期化 4 遺伝子が同一ベクター上に搭載されているため、誘導効率が安定しており、質の高い iPS 細胞を高効率で誘導可能となった。そこで本培養系を用いて鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) 由来 iPS 細胞を誘導し、樹立維持に成功した (Yamasaki S. et al. In Vitro Dev Biol 2015)。センダイウイルスを使用することで、ゲノム DNA へウイルス由来遺伝子挿入がなく、腫瘍化の原因と成り得ない安全なヒト iPS 細胞の樹立が可能となり、さらに無血清培養系において動物由来蛋白を含まず、感染症等の恐れのない安全で高品質のヒト iPS 細胞の供給が可能となったことで、難病の原因究明や治療法の開発を目指した疾患研究、医薬品の安全性試験などへの利用、細胞製剤の開発などの創薬研究、神経や血液・組織や臓器の機能修復や再生を目指した再生医療への応用を推進する上で有利となる。

また、その他にも本無血清培養系にて、フィーダー細胞を用いず Noonan 症候群、Cowden 症候群、基底細胞母斑症候群、von Recklinghausen 病等の各患者から疾患特異的ヒト iPS 細胞を誘導することに成功した。これら樹立した細胞は GMP に準拠した細胞培養センター (CPC) と自動細胞凍結保存システムに保存しバンキングを行っている。

< 鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) iPS 細胞を用いた発症メカニズムおよび原因究明 >

樹立した複数例の CCD 患者由来 iPS 細胞を用いて、遺伝子変異部位のゲノム編集を目指し、人工ヌクレアーゼ (CRISPER/Cas9) を構築し変異部位配列の正常化を行った。得られた改変株を用いて、分化誘導時の特性解析につい

て正常人由来 iPS 細胞との比較検討中である。また本疾患の原因遺伝子産物 Runx2 は軟骨細胞分化、破骨細胞分化、歯の発生に重要な因子であるため、現在骨・軟骨細胞系列への分化誘導を行い、健康人由来 iPS 細胞と各種分化マーカーを用いて、遺伝子発現解析を遂行中である。

< Cowden 症候群 iPS 細胞を用いた解析 >

Cowden 症候群は原因遺伝子として PTEN 遺伝子に変異を認める遺伝性疾患である。特徴的な皮膚病変を有し、口腔粘膜を含めた全消化管に過誤腫性ポリポシスを生じる。また、多臓器に腫瘍性病変を合併することが多く、癌抑制遺伝子である PTEN が欠損すると PIP3 の産生亢進が進み主に下流の Akt が活性化されることで細胞死抵抗性となり、多くの悪性腫瘍において PTEN の変異が認められている。Cowden 症候群との臨床診断を得た患者から血球を採取し次世代シーケンサーを用いて PTEN 遺伝子の変異部位特定を行った (c.1020delT および c.1026G>A)。同 Cowden 症候群患者より樹立した iPS 細胞を用いて、変異型における細胞増殖亢進やアポトーシス抵抗性、幹細胞の未分化性維持、セントロメアの不安定性、DNA 修復異常等について検討中である

#### 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 5 件)

1. 濱田充子、山崎佐知子ら他 8 人：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：日本口腔組織培養学会誌，査読無，第 25 巻第 1 号 23-24, 2016
2. 赤木恵理、山崎佐知子ら他 11 人：フィーダー細胞フリー・無血清培養系条件でのヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) の誘導と長期培養，査読無，日本口腔組織培養学会誌第 25 巻第 1 号 21-22, 2016
3. S Yamasaki，他 7 人：Generation of Cleidocranial dysplasia-specific human iPS cells in completely serum-, feeder-, and integration-free culture: *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. DOI 10.1007/s11626-015-9968-x 2015 査読有
4. S Yamasaki 他 5 人：Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF- $\beta$ 1 regulation of pluripotency. *PLoS One*. 201429;9(1):e87151 査読有
5. 赤木恵理、山崎佐知子，他 5 人：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リンパ球からの hiPS 細胞の樹立と維持に関する研究：日本口腔組織培養学会誌第 24 巻第 1

号 51-52, 2014 査読無

[学会発表](計 10 件)

1. 赤木恵理、山崎佐知子ら他 7 人：セグア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ヒト単核球からのヒト iPS 細胞の樹立と維持に関する研究：第 69 回日本口腔科学会学会術集会，大阪 2015/5/14
2. 中嶋洋隆、山崎佐知子ら他 4 人：口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) における rBC2LCN の癌幹細胞マーカーとしての有用性の検討：第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学会術集会，大阪 2015/5/14
3. H NAKATAO, S Yamasaki ら他 7 人：Generation and maintenance of integration-free human induced pluripotent stem (hiPS) cells from peripheral blood mononuclear cells in serum- and feeder-free growth factor defined medium：2015 In vitro biology biology meeting, 2015/6/3, Tucson, Arizona, USA
4. 林靖也、神田拓、山崎佐知子，他 8 人：口腔内多発腫瘍から Cowden 症候群の診断を得られた 1 例：第 25 回日本口腔内科学会学会術大会総会，大阪 2015/9/18
5. 赤木恵理、山崎佐知子，他 5 人：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リンパ球からの hiPS 細胞の樹立と維持に関する研究：第 68 回日本口腔科学会総会 (東京)，2014.5.7-9. 第 24 巻第 1 号 51-52, 2014
6. 濱田充子、山崎佐知子，他 5 人：セグアイウイルスを用いたフィーダーフリー・無血清培養系での歯髄細胞由来 hiPS 細胞の樹立と長期培養：第 68 回日本口腔科学会総会 (東京) 2014.5.7-9.
7. E Akagi, S Yamasaki，他 5 人：Reprogramming efficiencies of DPCs-derived hiPS cells with various virus vectors in serum- and feeder-free culture conditions.：2014 World Forum on Biology, Savannah USA, 2014.5.31-6.4
8. A Hamada, S Yamasaki 他 5 人：Generation and maintenance of hiPSCs in serum-free and feeder-free culture conditions using Sendai virus vectors：2014 World Forum on Biology, Savannah, USA, 2014.5.31-6.4
9. 赤木恵理、山崎佐知子，他 5 人：セグア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リンパ球からの hiPS 細胞の樹立と維持に関する研究：第 51 回日本口腔組織培養学会学会術大会 (小倉) 2014.11.15
10. E Akagi, S Yamasaki et al. 他 5 人：Generation and maintenance of hiPSCs in serum-free and feeder-free culture conditions using Sendai virus vectors: The 3th International Symposium Suggestion for the Renaissance from

Radiation Disaster: 2014/2/15 Hiroshima

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

【特許出願】

名称：iPS 細胞の樹立方法および幹細胞の長期維持方法

発明者：岡本哲治、山崎佐知子、嶋本顕、田原栄俊

権利者：岡本哲治、山崎佐知子、嶋本顕、田原栄俊

種類：13080-JP 51400854509

番号：特願 2014-87314

出願年月日：平 26. 4.21

国内外の別：国際出願番号 61/920868

取得状況(計 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 佐知子 (YAMASAKI Sachiko)

広島大学,病院(歯)病院助教

研究者番号：00632001

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：