

論文内容要旨

鎖骨頭蓋異形成症（CCD）患者歯髄細胞由来疾患特異的
ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）の単層無血清培養系
での樹立およびその細胞特性に関する研究

応用生命科学部門分子口腔医学・顎顔面外科学

（主指導教員：岡本 哲治 教授）

基礎生命科学部門細胞分子薬理学

（副指導教員：兼松 隆 教授）

基礎生命科学部門硬組織代謝生物学

（副指導教員：吉子 裕二 教授）

向笠 英恵

論文内容要旨

論文題目 鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) 患者歯髓細胞由来疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の単層無血清培養系での樹立およびその細胞特性に関する研究

学位申請者 向笠 英恵

【目的】

近年の人工多能性幹 (iPS) 細胞研究は、発生生物学や創薬・疾患研究のみならず、再生医療研究分野においても注目されている。さらに種々の遺伝性疾患の発症機序や治療法を解明する上で、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究も期待されている。

本研究では、*Runx2 (Cbfa1)* の変異により発症する常染色体優性遺伝性で、顎顔面口腔領域を含めた骨・軟骨・歯の分化異常を示す、鎖骨頭蓋異形成症 (Cleidocranial Dysplasia : CCD) 患者の歯髓由来細胞 (Dental Pulp Cell: DPC) から、無血清培地 hESF9 を用いてフィーダー細胞を用いることなく疾患特異的ヒト iPS 細胞を誘導し、その細胞特性解析を行った。

【方法】

広島大学病院顎・口腔外科を受診し、同意の得られた CCD 患者および健常人患者の抜去歯牙の歯髓組織より無血清培養系で分離培養した DPC より誘導した iPS 細胞 (CCD-iPS, DPC-iPS) および、国立成育医療センターにて樹立されたヒト iPS 細胞株 Tie (JCRB1331) を用いた (広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認研究計画 : 第 58 号)。

無菌的に採取した歯髓組織をメスで細切後、explant 培養法にて I 型コラーゲンコートした dish 上で、無血清培地 RD6F 培地 (RD 培地に insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite およびオレイン酸を添加) を用いて DPC の初代培養を行った。約 30 日間継代培養後、濃縮可能なレトロウイルス産生株 293GPG (東京大学医科学研究所より供与) およびレトロウイルスの 15 倍濃縮液を使用し、初期化 4 遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc) を感染させた。感染 5 日後に fibronectin 上に播種し、hESF9 培地 (hESF6 培地に FGF-2、ヘパリンおよび遺伝子組換えヒトアルブミン結合オレイン酸を添加) を用いて、フィーダー細胞や動物由来成分や代替血清を用いることなく、全過程を通じて無血清培養系にて CCD-iPS 細胞の誘導を行った。

CCD-iPS における各種未分化マーカー遺伝子および蛋白の発現を、RT-PCR 法および蛍光免疫染色法にて検討した。また、多分化能を検討するため、分化誘導培地を用いて低吸着プレート

(PrimeSurface®) 上に播種し、3 日間胚様体形成後、ゼラチンコート上に播種し培養 2 週後に蛍光免疫染色法にて各種分化マーカー蛋白の発現を解析した。さらに、20 代継代維持した CCD-iPS を免疫不全マウス (SCID mouse) の背部皮下に移植し、teratoma 形成能および 3 胚葉への分化能を組織学的に検討した。また、CCD-DPC および CCD-iPS の short tandem repeats (STR) 解析ならびに DNA シークエンス解析にて *Runx2* 遺伝子の変異解析を行った。

別紙様式 2

次に、iPS 細胞をコラーゲンコート上に播種し、骨分化培地 (Lonza®) を用いて 4 週間培養後、2、3、4 週ごとに RNA を採取し、Droplet Digital PCR (ddPCR) にて各分化マーカー遺伝子の発現解析並びに Alizarin Red 染色および Alkaline Phosphatase 染色を行った。また、CCD-iPS、DPC-iPS および Tic を低吸着プレート上に播種し、軟骨分化培地 (Lonza®) を用いて胚様体形成を行い、胚様体における遺伝子発現をリアルタイム PCR および ddPCR にて解析するとともに、H-E および Alcian Blue & PAS 染色にて組織学的に検討した。

【結果】

CCD-DPC に初期化 4 遺伝子を導入後、19 日後より iPS 細胞様コロニーの出現を認めた。感染 38 日後にコロニーを pick up し hESF9 培地を用いて継代維持を行った。ALP 陽性コロニーをカウントしたところ、60mm dish では 1.74%、100mm dish では 0.25% と高い誘導効率を示した。

RT-PCR 解析の結果、CCD-iPS は未分化マーカー遺伝子、Sox2、Nanog、Oct3/4、Esg1 および Rex-1 の発現および、蛍光免疫染色法にて Oct3/4、Nanog、SSEA4、Tra-1-60 および Tra-1-81 の未分化マーカー蛋白の発現を認めた。一方、CCD-DPC ではこれら遺伝子発現は認めなかった。

胚様体を蛍光免疫染色にて解析した結果、神経系マーカー、 β -III tubulin、MAP-2、中胚葉マーカー、SMA、内胚葉マーカー、AFP 蛋白の発現を認めた。CCD-iPS は免疫不全マウスの背部皮下において teratoma を形成し、組織学的に検討したところ、3 胚葉へ分化した組織が混在していた。

STR 解析の結果、CCD-iPS は CCD-DPC 由来であることが確認され、DNA シークエンス解析にて CCD-DPC および CCD-iPS のいずれにおいても、exon 3 の 674 番目の塩基アデニンがグアニンに変異していた。この変異は 225 番目のアミノ酸アルギニンのグルタミンへの置換を示唆した。

骨分化誘導後の Alizarin Red 染色および Alkaline Phosphatase 染色では、control (DPC-iPS および Tic) と比較して CCD-iPS では染色強度が著しく低下していた。ddPCR 解析により、CCD-iPS は DPC-iPS と比較し、Runx2, SPP1, BGLAP, IBSP, ALP, および Osteonectin の遺伝子発現が低下していた。

軟骨分化誘導後 Alcian Blue & PAS 染色を行ったところ、control と比較して Alcian Blue 陽性細胞数が低下していた。ddPCR 解析により、CCD-iPS は control と比較し、Runx2, IBSP, COL1A1 および COL10A1 の遺伝子発現が低下していた。

【結論】

本研究の結果、遺伝性疾患である CCD 由来 DPC よりフィーダー細胞を用いない単層無血清培養系を用いて CCD-iPS 細胞の誘導・樹立に成功した。CCD-iPS 細胞は、未分化性と多分化能を有しており、骨・軟骨分化誘導時に疾患個体で認められる各種分化マーカー遺伝子や蛋白の発現低下を示したことから、CCD の病態を反映する疾患特異的細胞モデルとして有用であると考えられた。本培養系を用いて、CCD を含めた種々の遺伝性疾患特異的 iPS 細胞を樹立することで、病態解明や治療法の開発に寄与すると考えられた。