

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

普天間拓

論文題目

シングルセル培養したヒト iPS 細胞から上皮細胞への
分化誘導方法の確立

(論文内容の要旨)

No. 1

愛知学院大学

諸言：上皮は、体表面および消化管などの内面を覆う組織であり、外界の刺激から保護する役割をもつ。発生学的には、胚盤葉上層の表面に形成された原始結節へ胚盤葉上層の細胞が遊走・陥入することで内胚葉および中胚葉へ分化し、内胚葉からは消化管などが形成される。そして胚盤葉上層に残存した細胞は外胚葉へ分化し胚子の表層を覆う。生体において外胚葉由来の表皮や角膜に傷害を受けた場合、組織を修復し、機能を回復させる目的で細胞を用いた再生医療が行われている。例えば、熱傷患者の治療に表皮から採取した上皮細胞由来の細胞シートが用いられているほか、角膜疾患の治療には口腔粘膜から採取した上皮細胞由来の細胞シートが臨床応用されている。しかし、それらの細胞シートの製造には動物由来成分を使用しており、病原体の伝播や感染の可能性が懸念されている。さらに安全性や倫理的な理由から再生医療に必要な細胞源を確保することが困難な場合もある。網膜色素上皮細胞 (RPE) 由来の細胞シートが再生医療に用いられていたが、RPE を採取する際に大量出血などの危険性が報告されている。歯科領域の再生医療研究においては、臨床応用可能な歯を再生させる方法はまだ確立されていない。これまでに歯の再生研究では、胎生期のマウス帽状期歯胚から採取した上皮細胞と間葉細胞を用いると、正常な歯冠形態を有する歯が再生した。しかし、成体のブタ下顎骨から摘出した鐘状期歯胚細胞から採取した上皮細胞と間葉細胞を用いると、正常な歯冠形態を有する歯は再生しなかった。この結果は、使用する細胞における発達段階の違い

いにより、再生される歯の形態が異なることを示唆している。しかし、正常な歯冠形態の再生をもたらした胎生期の細胞を使用することは倫理的な観点から臨床への応用は困難と考える。したがって RPE や歯の再生研究のように、細胞源の確保が困難な場合、再生する組織に適した細胞源を探索する必要がある。2006年に発表された iPS 細胞は三胚葉すべての細胞に分化する多能性を有しており、再生医療における有用な細胞源となることが期待されている。従来の iPS 細胞および ES 細胞の培養方法は、フィーダー細胞上でコロニー培養する方法が主流であった。しかし、この方法で培養された ES 細胞は不均質な細胞特性が指摘されている。また動物由来の細胞をフィーダー細胞として利用するため、病原性汚染物質が存在する可能性を否定できない。そこで近年、コロニーを形成することなくシングルセルで iPS 細胞を培養できる方法が考案された。この方法を用いて培養したヒト iPS 細胞から腭臓上皮および神経幹細胞への分化誘導方法はすでに報告されている。しかし、シングルセルで培養した iPS 細胞から表皮外胚葉由来の上皮細胞に分化誘導する方法はこれまでに報告されていない。そこで、本研究ではシングルセルで培養したヒト iPS 細胞が表皮外胚葉由来の上皮細胞へ分化能を有するか検討し、その誘導方法の確立を目的とした。

材料及び方法：ヒト iPS 細胞 (253G1 株) は DEF-CS 500 培地を用いてシングルセル培養した。シングルセル培養した iPS 細胞から RNA を抽出し多能性マーカー (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) の遺伝子発現解析をすることで

多能性の維持を確認した。次に上皮細胞へ誘導するために iPS 細胞を DEF-CS 500 培地で 1 ~ 2 日間シングルセル培養した後に DMEM-F12 に 1 X N2 supplement、1 μ M retinoic acid (RA) および 25 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4) を添加した上皮細胞誘導培地で培養し分化誘導を試みた。

分化誘導は最長 28 日間実施し、位相差顕微鏡を使用して細胞形態の観察をした。分化誘導した細胞においては未分化マーカー (*OCT3/4*)、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー (*P63*、*CK18* および *CK14*)、上皮細胞接着マーカーである (*CDH1* および *CLDN1*) の遺伝子発現を誘導 3、7、10、14、21 および 28 日目で解析した。また、ウエスタンブロットで誘導 3 日目、14 日目および 28 日目における *P63*、*CK18* および *CK14* のタンパク発現を調べた。さらに免疫染色では誘導 7 日目の細胞における *CK18* のタンパク発現と誘導 14 日目の細胞における *P63* および *CK14* のタンパク発現を調べた。

結果：シングルセル培養した iPS 細胞は、多能性マーカー (*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、および *c-MYC*) を発現していた。次にシングルセル培養した iPS 細胞を上皮細胞へ誘導すると誘導 7 日目に細胞形態が敷石状に変化した。次に誘導中の細胞における未分化マーカー遺伝子 (*OCT3/4*)、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー遺伝子 (*P63*、*CK14* および *CK18*)、および上皮細胞接着分子マーカー遺伝子 (*CDH1* および *CLDN1*) の発現を解析した。*OCT3/4* は誘導 3 日目では発現していたが、誘導日数が進むにつれて発現が低下した。一方で、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー遺伝子の発現は、まず *CK18* が誘導 7 日目

で、次いで *P63* が誘導 14 日目で、そして *CK14* が誘導 28 日目でピークを迎えた。また、上皮細胞接着分子マーカー遺伝子は、*CDH1* が誘導 3 日目から 21 日目の発現量に比べて、誘導 28 日目で発現量が減少した。*CLDN1* は誘導 3 日目から 21 日目の発現量に比べて、誘導 28 日目で発現量が増加した。ウェスタンブロットを用いたタンパク発現解析では、*CK18* は誘導 3 日目で検出され、14 および 28 日目ではより強く発現していた。また、*P63* は誘導 14 日目と 28 日目で同程度の強い発現が検出され、*CK14* は誘導 14 日目で強い発現が検出された。さらに蛍光抗体法による解析では、誘導 7 日目に抗 *CK18* 抗体に陽性な細胞が観察された。また誘導 14 日目では抗 *P63* 抗体および抗 *CK14* 抗体に陽性な細胞が観察された。

考察： シングルセルで継代し培養したヒト iPS 細胞は、多能性マーカー (*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4* および *c-MYC*) の遺伝子を発現していた。ES 細胞の研究から、多能性は *OCT3/4*、*SOX2* および *NANOG* に関与する一連の転写因子により制御されており、シングルセル培養したヒト iPS 細胞は多能性を維持していることが示唆され、三胚葉すべてに分化する可能性が考えられる。

次に、シングルセル培養したヒト iPS 細胞を上皮細胞誘導培地で 28 日間培養すると、誘導中の細胞は、誘導期間に応じて特徴的な遺伝子発現パターンを示すことが明らかになった。誘導中の細胞における遺伝子発現結果は誘導 7 日目に *OCT3/4* の発現が低下し、*CK18* の発現が上昇した。そして、誘導 14 日目に *P63* が、誘導 28 日目に *CK14* が発現のピークを迎えた。上皮の

発生には、特徴的な遺伝子発現を示すことが報告されている。胎児の発生過程では、まず、体表面が CK18 陽性細胞からなる単層上皮で覆われる。発生が進むにつれて、この単層上皮には、重層化への発達に関与する p63 が発現する。そして、CK18 陽性細胞が CK14 陽性細胞に置換されながら重層化すると考えられている。また、上皮細胞接着分子マーカーである *CLDN1* はタイト結合の構成成分であり、*p63* の下流標的として表皮発達に必須であると報告されている。本研究の結果においても誘導 28 日目の細胞で *CLDN1* の発現がピークを示した。このような表皮外胚葉への分化メカニズムは、上皮細胞誘導培地に含まれる BMP4 が重要な役割を果たしている。BMP4 は、Sox1 (神経外胚葉マーカー) 陽性である神経前駆細胞の細胞死を誘導することで神経外胚葉への分化を阻害すると同時に、上皮の維持に必要な *p63* のアイソフォームである Δ Np63 を直接活性化する。その結果、 Δ Np63 の発現量が増加し、CK14 プロモーターが活性化することで表皮外胚葉への分化が促進される。また、上皮細胞誘導培地に含まれる RA は、神経外胚葉への分化を防ぐとともに Δ Np63 の発現を上昇させる機能があることが報告されている。つまり、誘導因子に含まれる両因子により、表皮外胚葉への分化が進行すると考えられる。表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーのタンパク発現を確認するために可溶画分におけるウェスタンブロットを実施すると、CK14 は誘導 14 日目で強い発現が検出された。この結果は誘導 28 日目に CK14 の発現量が上昇した遺伝子発現解析の結果と異なるものであった。これはケ

ラチノサイトへの分化時に、多くのジスルフィド結合が形成され、不溶性のタンパク質が生成されることが報告されており、本結果も上皮細胞への分化が進行するにつれて、不溶性のタンパク質が生成されCK14は不溶画分にある可能性が示唆される。以上のことより、シングルセルで継代し培養したiPS細胞を上皮細胞誘導培地で28日間誘導し継時的に遺伝子発現解析すると、表皮外胚葉由来の上皮発生に関する遺伝子発現パターンと類似した結果を得ることができた。さらにウエスタンブロットおよび蛍光抗体法を用いて表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーのタンパク発現を確認することで、シングルセル培養したiPS細胞が表皮外胚葉由来上皮細胞へ分化することを明らかにした。

まとめ：シングルセル培養したヒトiPS細胞を上皮細胞誘導培地で誘導すると、表皮外胚葉由来上皮細胞の特性を有することが明らかになった。この結果から、シングルセルで培養したヒトiPS細胞を表皮外胚葉由来の上皮細胞に分化誘導させる方法が確立できたと考えている。シングルセルで培養したヒトiPS細胞から誘導された表皮外胚葉由来上皮細胞が再生医療にとって有用な細胞源になると期待される。