

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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	

I. 緒言

上皮は、体表面および消化管や体腔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ち、部位に特化した機能を兼ね備えている。上皮組織を構成する上皮細胞には、自由表面を覆う頂端部と結合組織に面する基底部といった2つの細胞極性がある。発生初期の原腸形成により、細胞は外胚葉、中胚葉および内胚葉の三胚葉へ分化する。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、膵臓および肝臓などが形成される。また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。

再生医療は、損傷した組織や臓器を修復し、機能を回復させることを目的とし、幹細胞や前駆細胞が利用されている。再生医療における細胞源は、細胞が有する特性に加えて、培養操作が煩雑ではなく、かつ大量に得られるような細胞が望ましい。これまでに上皮細胞を利用した再生医療として、自家培養表皮は熱傷、また自家培養口腔粘膜上皮は角膜炎の治療に臨床応用されている。しかしながら、移植する上皮細胞の製造にかかわる典型的な培養条件は、マウス3T3フィーダー細胞やウシ胎仔血清(FBS)を必要とする。そのため、動物由来成分からの病原体の伝播や感染の可能性を排除することが難しいことがひとつの課題ともいえる。さらに、安全性や倫理的な理由から、細胞源を確保することが困難な場合もある。例えば2000年代初頭に網膜色素上皮細胞(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や網膜剥離といった危険性が報告されている。

歯科領域の再生医療の研究において、臨床応用を可能とする歯を再生させるための方法は、まだ確立されていない。これまでの歯の再生研究によると胎生14日または14.5日のマウス帽状期歯胚の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の上皮細胞と間葉細胞を用いると、正常ではない、不規則な歯冠形態を有する歯が再生した。この研究結果は、胎生期にある歯胚の細胞は歯を形成する能力を有してしていることを示唆し歯の再生を可能とするが、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、網膜や歯の再生研究の例のように、再生医療を実現させ、さらに発展させるには、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TakahashiとYamanakaは、マウス線維芽細胞からの人工多能性幹(iPS)細胞の誘導に成功し、さらに翌年にはヒト線維芽細胞からiPS細胞の誘導にも成功した。iPS細胞はヒト胚性幹(ES)細胞の使用に伴う倫理的な問題を解決し、さらに三胚葉全ての細胞に分化する多能性を有するため、疾患メカニズムの解明、薬物スクリーニングおよび再生医療の細胞源として広く応用できることが期待されている。

従来のiPS細胞の培養方法は、マウス胎仔線維芽細胞(MEF)といった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が、培養操作が煩雑かつ大量培養が困難であり、手技のばらつきが生じやすいと言われていた。また、コロニーを構成する細胞は不均質な細胞特性と緩やかな増殖が指摘された。さらに、MEF上で培養した多能性幹細胞は免疫源となる非ヒトシアル酸を発現し、移植時に免疫反応を誘発する可能性が報告された。これらの問題を解決するために、培地やディッシュへのコーティング剤が改良され、フィーダー細胞を用いずに多能性幹細胞をゼノフリーかつシングルセルで培養する方法が考案された。しかし、これらのシングルセルで培養する方法はRhoキナーゼ阻害剤を添加することにより、シングルセルでの継代を可能としたが、継

代した細胞はコロニーを形成して増殖する結果となる。そこで iPS 細胞を継代した時にコロニーを形成することなくシングルセルにした iPS 細胞を培養できるような方法が望まれる。

近年、シングルセルで iPS 細胞を継代および培養できる Cellartis®DEF-CS™ 500 Culture medium (DEF-CS medium; Takara, Shiga, Japan) が考案された。この方法は、iPS 細胞のシングルセルクローニングやゲノム編集における効率が良く、安定した多能性と正常な核型を維持している。再生医療の臨床応用において iPS 細胞を効率よく増殖させることは重要であり、DEF-CS medium を用いて培養したヒト iPS 細胞から膀胱上皮および神経幹細胞への分化誘導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への分化はこれまでに報告されていない。したがって、本研究ではコロニーを形成せず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の分化能を有するかを検討し、その誘導方法を確立することを目的とした。

II. 材料および方法

II-1. コロニー培養した iPS 細胞

ヒト iPS 細胞 253G1 株は未分化状態を維持するために、マイトマイシン処理で不活化した MEF をフィーダー細胞として、1:1 Dulbecco's modified Eagle medium:Ham's nutrient mixture F-12 (DMEM-F12; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 20% KNOCKOUT Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、0.1 mM nonessential amino acid (Thermo Fisher Scientific)、0.11 mM 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific)、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) および 5 ng/ml recombinant human basic fibroblast growth factor (Fujifilm Wako, Osaka, Japan) を添加した培地を用いてコロニーで培養した。

II-2. シングルセル培養した iPS 細胞

コロニー培養した iPS 細胞を、TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) で酵素処理 (37°C、5 分間) をしてディッシュから剥がし、DEF-CS 培地を加えてコロニーを崩すように回収した。その後、細胞懸濁液を遠心分離 (24°C、200 \times g、5 分間) した。上清を除去後、DEF-CS 培地で懸濁して細胞数をカウントした。そして、事前に準備した、カルシウムおよびマグネシウムを含有したダルベッコリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS; Fujifilm Wako) で希釈した COAT-1 (Takara) でコーティングしたディッシュへ iPS 細胞を播種 (2×10^4 cells/cm²) した。シングルセル培養へ移行した iPS 細胞に対し、DEF-CS 500 培地を毎日交換しながら培養をした。そして、フィーダー細胞は 2~3 継代することで完全に除去され、iPS 細胞は 3~4 日ごとに継代し、必要な細胞数を確保した。なお、実験に先立ち、シングルセル培養した iPS 細胞の未分化性の維持を確認するために、II-4. で示す方法にて、多能性マーカー (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) の発現をリアルタイム PCR で解析し、コロニー培養した iPS 細胞と比較した。

II-3. iPS 細胞から上皮細胞への誘導

Cai らの方法を参考にし、iPS 細胞から上皮細胞へ分化誘導を試みた。はじめにシングルセルで培養した iPS 細胞の分化能を確認するために、シングルセル培養した iPS 細胞を以下に記載した上皮細胞誘導培地で 7 日間培養し、II-4. で示す方法にて、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカ

一の発現を解析した。また、陽性対照としてコロニー培養した iPS 細胞を使用した。

次に、上皮細胞への誘導に適したコーティング材料を決定するために、3種類の異なるコーティングをしたディッシュ：コラーゲンIV (Corning BioCoat Cellware, Mouse collagen type IV 60-mm dishes, 354416; Corning, Bedford, MA, USA)、マトリゲル (Corning BioCoat Matrigel Cellware, 60-mm dishes, 354601; Corning)、および COAT-1 (Takara) ヘシングルセル培養した iPS 細胞を播種した (4×10^5 cells/cm²)。DEF-CS 培地で1~2日間培養した後、DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) に1X N2 supplement (Thermo Fisher Scientific)、1 μ M retinoic acid (RA; Fujifilm Wako) および25 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4; Fujifilm Wako) を添加した上皮細胞誘導培地へ置き換えた。上皮細胞への分化誘導は最長28日間実施し、位相差顕微鏡での細胞形態の観察と cell counter model R1 (Olympus, Tokyo, Japan)を用いて継時下で細胞数を計測した(細胞増殖アッセイ)。なお、上皮細胞誘導培地は毎日交換した。

II-4. リアルタイム PCR

表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーである tumor protein p63 (*P63*)、cytokeratin (CK) 18 (*CK18*) および *CK14* の遺伝子発現を解析するために、iPS細胞、および誘導3、7、10、14、21および28日目の細胞を回収し、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用して Total RNA を抽出した。また iPS細胞253G1株由来の神経堤細胞から抽出した RNA を陰性対照として使用した。RNA濃度は、NanoDrop 1000分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) で測定した。100 ngの total RNA から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo, Osaka, Japan) を使用して First-strand complementary DNA (cDNA) を合成した。cDNA サンプル (2 μ l) および TB Green Premix Ex Taq II (Takara) を用いてサーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice Real-Time System III, Takara) でリアルタイムPCRを実施 (95°Cで5秒間、60°Cで30秒間を40サイクル) したのち、LCDソフトウェア (Takara) を使用した。なお、リアルタイムPCRのデータは、独立した3回の実験から結果を得た。mRNA発現レベルは human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) の発現量で校正し、未分化状態のヒト iPS細胞の発現量と比較して相対発現量を計算した。

また、iPS細胞から上皮細胞への分化誘導に伴って変化する細胞接着分子に関連する遺伝子を検索した。検索には、細胞接着マーカー遺伝子88種およびハウスキーピング遺伝子8種を含むリアルタイムPCR用のプライマーアレイ (PrimerArray Cell adhesion molecules [Human] PH003; Takara) を使用し、得られたデータは PrimerArray Analysis Tool Version 2.2 (Takara) で解析した。

なお、iPS細胞(シングルセル培養およびコロニー培養)に発現する未分化マーカーを調べるために、増幅されたDNA断片を2%アガロースゲルで電気泳動 (Mupid-2; Advance Co. Ltd., Tokyo, Japan) し、ミドリグリーン Advance (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) で染色後に、紫外線照射下で観察した (Gel Doc EZ Imager; Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA)。また、iPS細胞(シングルセル培養およびコロニー培養)の分化能を確認するために、それぞれの方法で培養した iPS細胞を上皮細胞誘導培地で7日間培養し、誘導細胞の表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーの発現レベルを誘導前と比較をした。

II-5. ウェスタンブロット

誘導 3、14および28日目の誘導細胞からMammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) でタンパク質を抽出した。タンパク質濃度は、BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific) で定量した。次にサンプルを4%~15%Mini-PROTEAN TGX gel (Bio-Rad Laboratories) で分離した後に、polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad Laboratories) に50 Vで1時間転写した。転写後、1X Tris-buffered saline (TBS) with 1% casein溶液 (Bio-Rad Laboratories) で室温、1時間ブロッキングをし、一次抗体として抗P63抗体 (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA)、抗CK14抗体 (1:500; Abcam)、抗CK18抗体 (1:500; Abcam) および抗GAPDH抗体 (1:10000; Thermo Fisher Scientific) を用いて4℃、18時間の条件でインキュベートした。TBS with Tween 20 (TBST) で洗浄後、二次抗体として抗mouse IgG (HRP) 抗体 (1:1000; Abcam) および抗rabbit IgG (HRP) 抗体 (1:1000; Thermo Fisher Scientific) を用いて室温、1時間の条件でインキュベートし、ClarityWestern ECL (Bio-Rad Laboratories) を使用し、Fuji LAS 4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) で検出した。

II-6. 蛍光抗体法

誘導細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBSで希釈した0.1% Triton X-100 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) を用いて透過処理をした。細胞を2.5% horse serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で1時間ブロッキングし、一次抗体として抗OCT3/4抗体 (1:40; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)、抗P63抗体 (1:100; Abcam)、抗CK14抗体 (1:100; Abcam) および抗CK18抗体 (1:200; Abcam) を用いて室温、16時間の条件でインキュベートした。またアイソタイプコントロールとして一次抗体と同じ濃度に調整した抗mouse IgG抗体 (Fujifilm Wako) および抗rabbit IgG抗体 (Gene Tex, Irvine, CA, USA) を用いた。二次抗体としてAlexa Fluor 488で標識された抗mouse IgG抗体 (1:200, 1:1000; Thermo Fisher Scientific) およびAlexa Fluor 594で標識された抗rabbit IgG抗体 (1:200; Thermo Fisher Scientific) を用いて室温、1時間の条件でインキュベートした。その後TBSTで洗浄し、1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Dojindo, Kumamoto, Japan) で対比染色をしてから、BZX-710 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。また、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーを発現する細胞の割合を求めるために、CK18、P63 およびCK14 陽性細胞数およびDAPI染色陽性数を求めた。そして、ランダムに選択された3つの視野で細胞数をカウント後に平均値を求め、陽性細胞率をCK18、P63 およびCK14 陽性細胞/総細胞 \times 100 (%) の計算式で求めた。

II-7. 統計処理

データは平均値 \pm 標準偏差で表し、Student's *t*-testによる有意差検定をMicrosoft Excel[®] for Mac (Microsoft, Redmond, WA, USA)でおこなった。なお、有意水準は5%とした。

III. 結果

III-1. シングルセル培養したiPS細胞における多能性維持の確認

リアルタイムPCR産物を電気泳動した結果、シングルセル培養したiPS細胞はコロニー培養したiPS細胞と同程度に多能性マーカー (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, および *c-MYC*) を発現していた。

III-2. シングルセル培養した iPS 細胞の分化能の確認

コロニーで培養した iPS 細胞は、上皮細胞誘導培地で 7 日間培養すると細胞形態が敷石状に変化した。そこで、シングルセル培養した iPS 細胞においても同培地で 7 日間培養した。そして、それぞれの方法で培養した iPS 細胞と誘導 7 日目の細胞とで、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー遺伝子の発現を比較してみると、誘導細胞は誘導前より有意に高かった ($P < 0.05$)。したがって、シングルセル培養した iPS 細胞における上皮細胞への分化傾向を確認できたことから、以降の実験はすべてシングルセル培養した iPS 細胞を用いることにした。

III-3. iPS 細胞から上皮細胞への誘導におけるコーティング材の検討

シングルセル培養した iPS 細胞を上皮細胞へ誘導する際の適切なコーティング材を検討するために、3 種類の異なる材料を用いて上皮細胞への誘導を試みた。iPS 細胞を COAT-1 でコーティングされたディッシュに播種すると、28 日間にわたって上皮細胞誘導培地で培養できた。誘導中の細胞形態は、誘導 7 日目に敷石状に変化し、さらに誘導を続けると細胞密度が高くなるのが観察された。一方で、コラーゲン IV でコーティングされたディッシュに播種した iPS 細胞は、播種後 12 時間では付着していたが、24 時間では剥がれてしまい、誘導にいたらなかった。またマトリゲルでコーティングされたディッシュに播種した iPS 細胞は、播種後 48 時間では付着していたが、誘導 6 日ではすべて剥がれてしまい、誘導を継続できなかった。以上より、28 日間の誘導が可能であったのは、COAT-1 でコーティングしたディッシュを利用した場合であった。そこで、シングルセル培養した iPS 細胞を、COAT-1 でコーティングされたディッシュへ播種して誘導細胞の増殖を確認したところ、誘導 3 から 10 日目にかけて、細胞数は 4.8 倍と直線的に増加したが、誘導 10 日目から 28 日目にかけて、細胞数は 1.5 倍と緩やかに増加した。

III-4. 誘導細胞の特性解析

III-4-1). リアルタイム PCR による解析

誘導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 (*cadherin1*; *CDH1* および *claudin1*; *CLDN1*) の mRNA 発現レベルを比較 Ct 法で解析した。*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、*OCT3/4* の低下に伴い、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 日目で一番高かった。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 日目まで同程度に発現していたが、誘導 28 日目で減少し、*CLDN1* が誘導 28 日目で急激に発現が増加した。実験は 3 回実施し、これらの遺伝子発現パターンは同様の傾向を示した。

また、プライマーアレイを使用し、誘導 3 日目を基準にして 14 および 28 日目における細胞接着分子マーカー遺伝子の相対発現量を求めた。そして、相対発現量の差が 2 倍以上ある遺伝子を選択した結果、Inducible T-cell co-stimulator ligand (*ICOSLG*)、Neural cell adhesion molecule (*NCAM1*) および Syndecan1 (*SDCI*) の 3 つの遺伝子が該当した。さらに、配列の異なるプライマーを用いて、再度リアルタイム PCR で解析したところ、誘導 14 日目よりも 28 日目で発現量が

2倍以上増加していることを確認した。

III-4-2). ウェスタンブロットによる解析

Mammalian Protein Extraction Reagent で抽出した可溶画分で実施しウェスタンブロットを用いて表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー (CK18、P63、および CK14) のタンパク発現を解析した。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。

III-4-3). 蛍光抗体法による解析

誘導 7 日目では未分化マーカーである抗 OCT3/4 抗体に陽性な細胞は観察されなかったが、抗 CK18 抗体に陽性な細胞が観察された。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。また誘導 7 日目および誘導 14 日目における表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー (CK18、P63 および CK14) の陽性細胞率を求めた。誘導 7 日目での CK18 陽性細胞率は 48.0%、誘導 14 日目での P63 陽性細胞率は 67.4%、CK14 陽性細胞率は 18.9%であった。また、誘導 7 日目と比較して 14 日目の細胞では、増殖により細胞密度が高くなった。

IV. 考察

本研究の目的は、コロニーを形成せずシングルセル培養したヒト iPS 細胞から表皮外胚葉由来の上皮細胞への分化誘導方法を確立することである。まず、DEF-CS medium 使用して、シングルセル培養したヒト iPS 細胞が、コロニー培養した場合と同様に、多能性マーカーを発現するかどうかを検討した。電気泳動の結果、シングルセル培養したヒト iPS 細胞は、コロニーで培養した時と同程度に *OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4* および *c-MYC* 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 細胞も、コロニー培養した iPS 細胞と同様に一連の転写因子の制御がされることで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。

そこで本実験では、これまでに報告された方法を参考にして、シングルセルで培養した iPS 細胞を、 $1 \mu\text{M}$ RA、25 ng/ml BMP4 および 1×10^{-8} N2 を添加した上皮細胞誘導培地で培養することで、上皮細胞への分化誘導を試みた。まず、ヒト iPS 細胞 253G1 株の上皮細胞への分化傾向を調べるために、コロニーおよびシングルセルの両培養法で維持した iPS 細胞を用いた。7 日間の誘導で、どちらのヒト iPS 細胞も上皮細胞に特徴的な敷石状の形態へと変化した。また、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー遺伝子 (*P63*、*CK18* および *CK14*) の発現は、誘導前に比べて有意に高かった。したがってシングルセルで培養したヒト iPS 細胞は、上皮細胞への分化傾向を有することが示唆された。

さらに、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーの発現を詳細に解析するために、シングルセルで培養したヒト iPS 細胞を上皮細胞誘導培地で 28 日間培養した。なお、本解析では、上皮細胞への誘導に適した COAT-1 をコーティングしたディッシュを使用した。誘導細胞の遺伝子発現は、誘導期間に応じて特徴的なパターンを示し、誘導開始の初期に *OCT3/4* の発現が低下するのに伴い、*CK18* の発現が上昇した。次いで *P63* が誘導 14 日目に、さらに *CK14* が誘導 28 日目に、発現のピークを迎えた。本実験結果で示した表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー遺伝子の発現パターンは、

これまでの報告と類似していた。上皮の発生には、特徴的な遺伝子発現がある。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、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。したがって、本結果は、生体の上皮発生に関する遺伝子の発現パターンとも類似していた。さらに上皮細胞接着分子マーカーの遺伝子発現解析で、*CLDN1* が誘導 28 日目にピークを示した。*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の発達に必須であると報告されている。

上皮細胞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して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 Δ Np63 を直接活性化し、 Δ Np63 の発現量が増加すると CK14 プロモーターが活性化される。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。

これまでの研究によると、BMP4 は、表皮への分化を誘導する因子だけでなく、上皮間葉転換 (EMT) を誘導することも報告されている。そこで、誘導細胞の上皮細胞接着マーカーを調べたところ、EMT 関連遺伝子でもある *ICOSLG*、*NCAM1* および *SDC1* の発現が、誘導 14 日目より 28 日目で高かった。また、誘導 28 日目には *CDH1* の発現レベルが減少していた。これらの結果は、EMT が進行するにつれて *NCAM1* の発現量が上昇し、*CDH1* の発現量が減少するという過去の報告に類似していた。この結果は、歯の再生研究に用いる上皮細胞への誘導期間を決定する上での一助となる。

さらに、誘導細胞の特性解析において、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ために、ウエスタンブロットと蛍光抗体法を実施した。誘導 3、14 および 28 日目の誘導細胞を用いたウエスタンブロットの結果は、CK18 および P63 は継時的な遺伝子発現解析の結果と同様の発現を示したのに対して、CK14 は誘導 14 日目で強い発現が検出された。本結果は可溶画分を用いてウエスタンブロットを実施したものである。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た。また、蛍光抗体法では、誘導 7 日目に CK18 が細胞質に、誘導 14 日目には P63 が核に、CK14 が細胞質にそれぞれ発現していた。これは今回のウエスタンブロットの結果を支持するものであり、多能性幹細胞を用いた上皮誘導に関するこれまでの研究結果と同様の傾向を示した。

本研究では、DEF-CS medium を使用して、コロニーを形成せずシングルセル培養したヒト iPS 細胞を RA、BMP4 および N2 を添加した上皮細胞誘導培地で培養すると、誘導細胞は敷石状の形態へ変化し、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーを発現した。今回使用した iPS 細胞株は 1 種類であったが、iPS 細胞が有するエピジェネティックな記憶を考慮すると、数種類のヒト iPS 細胞株か

ら表皮外胚葉由来上皮細胞への分化誘導を検討する必要がある。また、歯の再生研究を遂行するにあたり、理想的な戦略は歯の発生過程を模倣することである。そこで、本研究で誘導した上皮細胞をすでに iPS 細胞から分化誘導法が確立している神経堤細胞と組み合わせて再構成歯胚を作製する。そして、*in vivo* 移植実験で発生過程を模倣した歯の再生を検討することを今後の研究課題とする。

V. まとめ

本研究では、シングルセル培養したヒト iPS 細胞を DMEM-F12 に N2、RA および BMP4 を添加した上皮細胞誘導培地で 28 日間培養したところ、誘導された細胞の細胞学的特性について、以下の結果および結論を得た。

1. シングルセル培養した iPS 細胞は多能性マーカーを発現していた。
2. シングルセルまたはコロニー培養した iPS 細胞を上皮細胞誘導培地で 7 日間培養したところ、どちらも誘導前と比較して表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーの発現量が有意に高かった ($P < 0.05$)。
3. シングルセル培養した iPS 細胞を上皮細胞誘導培地で培養すると、COAT-1 でコートしたディッシュに播種した場合にのみ 28 日間誘導できた。
4. シングルセル培養した iPS 細胞を COAT-1 でコートしたディッシュに播種して上皮細胞誘導培地で培養すると、誘導 7 日目に細胞は敷石状の形態を示した。
5. 誘導細胞の継時的な遺伝子発現解析から、誘導日数が進むにつれて、多能性マーカーである *OCT3/4* の発現は低下した。また、表皮外胚葉由来上皮細胞のマーカーである *CK18* は誘導 7 日目、*P63* は誘導 14 日目、および *CK14* は誘導 28 日目で、一番発現が高かった。
6. 細胞接着分子マーカーのプライマーアレイで、誘導 14 日目より 28 日目で発現が 2 倍以上となる遺伝子は、EMT 関連遺伝子でもある *ICOSLG*、*NCAM1* および *SDC1* の 3 遺伝子であった。また、細胞接着分子マーカーの遺伝子発現解析から、誘導 28 日目で *CDH1* の発現量が減少し、*CLDN1* の発現量が増加した。
7. ウェスタンブロットによる表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーの発現解析から、*CK18* は誘導 3 日目で検出され、14 および 28 日目で増強した。また、*P63* は誘導 14 および 28 日目で、*CK14* は誘導 14 日目で強く検出された。
8. 蛍光抗体法による表皮外胚葉由来上皮細胞マーカーの発現解析から、誘導 7 日目の *CK18* 陽性細胞率は 48.0%、誘導 14 日目の *P63* 陽性細胞率は 67.4%、および *CK14* 陽性細胞率は 18.9%であった。

以上の結果から、シングルセル培養したヒト iPS 細胞は多能性を維持しており、また、上皮細胞誘導培地で 28 日間誘導された細胞は、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。すなわち、シングルセル培養した iPS 細胞は表皮外胚葉由来上皮細胞へ分化し、誘導された上皮細胞は再生医療研究にとって有用な細胞源となる可能性を示すものである。