

# 論文内容要旨

単層無血清培養系での歯髄由来細胞を用いた  
ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立および維  
持に関する研究

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菌学

(副指導教員：菅井 基行 教授)

統合健康科学部門小児歯科学

(副指導教員：香西 克之 教授)

田 口 有 紀

## 論文内容要旨

論文題目 単層無血清培養系での歯髓由来細胞を用いたヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立および維持に関する研究

学位申請者 田口有紀

### 【目的】

胚性幹 (Embryonic Stem:ES) 細胞や人工多能性幹 (induced Pluripotent Stem:iPS) 細胞は、不活化したマウス胎仔由来線維芽細胞 (フィーダー細胞) を支持細胞として、血清添加培地を用いて培養されている。しかし、このような培養条件では、これらの細胞の増殖や分化を再現性よく制御することは出来ない。また、増殖・分化制御機構や制御因子を詳細に検討することは非常に困難である。

本研究では、フィーダー細胞を用いず、すべての組成が明らかな無血清单層培養系を用いて、歯髓由来細胞からヒト iPS 細胞の樹立ならびに維持を目指した。

### 【方法】

本実験は、広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて承認を得た研究計画 (第ヒ - 58 号) に基づき行った。すなわち、広島大学病院顎・口腔外科を受診し、同意の得られた健常人患者由来抜去埋伏智歯の歯髓由来細胞 (Dental Pulp Cells:DPC) より誘導した iPS 細胞および国立成育医療センターにて樹立され、(独) 医薬基盤研究所より供与された樹立ヒト iPS 細胞株 Tic (JCRB1331) を用いた。

無菌的に採取した埋伏智歯由来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) にて DPC の初代培養を行った。継代数 2 の DPC に、レトロウイルスを用いて初期化 4 遺伝子 (*Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc*) を導入した。導入 5 日後の細胞を、hESF6 培地に FGF-2、ヘパリンおよび脂肪酸不含遺伝子組換えヒトアルブミン結合オレイン酸を添加した hESF9 培地を用い、fibronectin 上に播種し iPS 細胞の誘導を行った。形成された iPS 様コロニーを pick up 後、hESF9 培地にてさらに培養した。Tic はフィーダー細胞上で血清添加 ES 細胞用培地を用いて培養維持した。

先行研究の結果、hESF9 培地を用いることで樹立ヒト iPS 細胞 (hiPSC) の未分化性と多分化能を継代数 25 まで維持できることが確認されている。今回、hESF9 培地を用いて、継代数 25 以上の長期間、未分化性の維持が可能かどうか、さらに transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) の長期継代および未分化性の維持に及ぼす影響について、細胞増殖試験、デジタル PCR 法および FACS 解析にて検討した。また、TGF- $\beta$ 1 の hiPS 誘導に及ぼす影響についても検討した。

また、hESF9T 培地 (hESF9+ TGF- $\beta$ 1) にて 1 年以上継代培養した hiPSC の、細胞増殖能お

## 別紙様式 2

および未分化性を RT-PCR 法を用いた各種遺伝子発現 (Oct3/4, Sox2, Nanog, ESG1, Rex1, DPPA2) さらには蛍光免疫染色法 (Oct3/4, Nanog, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81) で解析した。次に、hiPSC-3 を 20 日間 FGF-2 およびヘパリンを含まない hESF6 培地にて培養し、蛍光免疫染色法にて各種分化マーカー ( $\beta$ -III tubulin,  $\alpha$ -smooth muscle actin(SMA),  $\alpha$ -fetoprotein(AFP)) の発現を解析した。さらに、hiPSC をスキッドマウスの背部皮下に移植し、teratoma 形成能および 3 胚葉への分化能を病理組織学的に検討した。また、DPC および hiPSC の short tandem repeats (STR) 解析をおこなうとともに、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法にて比較検討した。さらに、hiPSC-3 の染色体解析を行った。

本培地の普遍性について検討するため、フィーダー細胞上で血清添加培地にて継代維持されている Tic を、hESF9T 培地にて継代培養し、その未分化性および多分化能を RT-PCR 法および蛍光免疫染色にて検討した。

### 【結果】

DPC に初期化 4 遺伝子を感染後、18 日目より iPS 細胞様コロニーの出現を認めた。形成されたコロニーを pick up し TGF- $\beta$ 1 の影響を検討した結果、TGF- $\beta$ 1 は hiPSC の増殖を濃度依存的に抑制した。また、デジタル PCR の結果、TGF- $\beta$ 1 は hiPSC における Oct3/4 および Nanog などの未分化マーカー遺伝子の発現を濃度依存的に促進した。さらに、FACS 解析の結果、TGF- $\beta$ 1 は hiPSC の Oct3/4 および SSEA4 蛋白の発現を促進した。一方、TGF- $\beta$ 1 は初期化 4 遺伝子を用いた hiPS の誘導効率を著しく抑制した。

次に、RT-PCR 解析の結果、hESF9T 培地で培養維持されている hiPSC は Oct3/4, Sox2, Nanog, ESG1, Rex1 および DPPA2 等の未分化マーカー遺伝子を発現し、また、蛍光免疫染色法にて Oct3/4, Nanog, SSEA4, Tra-1-60 および Tra-1-81 の蛋白発現を示した。一方、分化誘導された hiPS は、 $\beta$  III tubulin, SMA および AFP 等の分化マーカー蛋白を発現していた。hiPSC はスキッドマウス背部皮下において teratoma を形成し、組織学的に 3 胚葉への分化を示した。また、hiPSC の遺伝子プロファイルは Tic のそれと近似していたが、DPC のそれとは明らかに異なっていた。STR 解析の結果、hiPSC は DPC 由来であることが確認され、その染色体は 46, XX を示した。

さらに、フィーダー細胞上で血清添加 ES 細胞用培地にて培養されていた Tic を、hESF9T 培地で継代培養したところ、5 継代以上に渡り、その未分化性および多分化能を維持可能であることが明らかとなった。

### 【結論】

本研究の結果、フィーダー細胞を用いない hESF9T 完全無血清単層培養系で、DPC 細胞の初代培養から hiPS 細胞の誘導、樹立および長期継代培養が可能であることが明らかとなった。従来、フィーダー細胞や動物由来成分を含む培養系では、hiPS 細胞等の幹細胞の標準化は困難であったが、本培養法を用いることで、これら幹細胞の未分化性の維持や増殖・分化を制御する各種因子の同定および検討が可能となり、発生・組織・臓器再生メカニズムの解明や、創薬スクリーニングへの応用、さらに安全で確実な再生医療の実現が可能となると考えられた。