

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17318

研究課題名(和文) 乳歯歯髄細胞由来iPS細胞からのLEF-1陽性幹細胞の単離

研究課題名(英文) Isolation of LEF-1 positive stem cells from primary dental pulp cell-derived iPS cells

研究代表者

村上 智哉 (Murakami, Tomoya)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90791517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：LEF-1は、胚性幹細胞の分化増殖に関係するWnt/カテニンシグナル伝達で重要な役割を担っている。我々は、LEF-1が乳歯歯髄細胞由来iPS細胞において分化増殖に関与していると考えた。本研究では、ヒトLEF-1プロモーターを用い、遺伝子工学的手法を利用することでLEF-1陽性乳歯歯髄細胞由来iPS細胞の単離を行うことを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究では、iPS細胞樹立の過程や幹細胞の増殖、分化制御に関わるとの報告が散見され、LEF-1陽性幹細胞樹立に関する研究は、妥当な方向に向いていると思われる。本研究で得られる「iPS細胞由来LEF-1陽性幹細胞」は、iPS細胞経由故、細胞数はほぼ無限に得ることができる。更に、組織幹細胞まで分化誘導出来るので、癌化のリスクを低減出来る。転写因子を標的とした今回の遺伝子工学的単離方法は、他の組織幹細胞単離にも応用可能であり、今後、このような試みを用いた研究は盛んになると予想される。その意味でも、歯系細胞由来の組織幹細胞研究のみならず、全身に存在する組織幹細胞研究への波及効果は大と考える。

研究成果の概要(英文)：LEF-1 is an important member of the Wnt/β-catenin signaling pathway that plays important roles in the self-renewal and differentiation of embryonic stem cells. We speculated that LEF-1 might function in the human deciduous dental pulp cells derived iPS cells. In this study, we attempted to isolate such LEF-1 positive stem cells from primary dental pulp cell-derived iPS cells by genetic engineering technology, using the human LEF-1 promoter.

研究分野：小児歯科学分野

キーワード：iPS細胞 LEF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児において交換期を迎えた乳歯は破棄されるのが一般的であった。近年、「HDDPCs には多分化能を有した歯髄幹細胞 (DPSc) が含まれる」との報告があり、HDDPCs は再生医療分野に貢献できる有望な細胞リソースと期待される。DPSc を単離するには、骨髄幹細胞特異的な細胞表面抗原である CD44, STRO-1 などのマーカーを用いた fluorescence activated cell sorting (FACS) などによる単離方法が多く報告されているが、HDDPCs 特異的な遺伝子マーカーについては未だ定まっていないのが現状である。一方、mRNA の転写 (DNA からの mRNA 合成) を促す DNA 制御領域プロモーター (多くは組織特異性を示す) の下流に蛍光遺伝子を連結させ、この構築体の遺伝子導入による組織幹細胞の同定 (これを「遺伝子工学的手法」と呼ぶ) についての報告も最近散見されるようになってきた。このような組織特異的なプロモーターを用いれば、いかなる種類の組織幹細胞の単離・濃縮も原則可能と言える。

申請者は、幹細胞の増殖や未分化の維持に関与するとされる Wnt シグナルの転写因子の 1 つ LEF-1 に着目し、このプロモーターに蛍光遺伝子を連結させたプラスミド (pTA-LEN) を用いて HDDPCs に含まれる「LEF-1 陽性細胞」の単離・濃縮に成功した。この「LEF-1 陽性細胞」は、分化誘導を促すと、骨系細胞、神経系細胞へと細胞分化し得ることが確認された。即ち、当該細胞は多分化能性を有し、組織幹細胞の性質を持つことが判明した。

2. 研究の目的

近年、乳歯を用いた再生医療が着目されている。申請者はこれまでの研究より、幹細胞の増殖や未分化の維持に関与する Wnt シグナルの転写因子の 1 つである lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF-1) に着目し、乳歯歯髄細胞 (HDDPCs) より転写因子を標的として LEF-1 陽性幹細胞を単離し、その多分化能性を明らかにした。本研究では、HDDPCs 由来 iPS 細胞から遺伝子工学的手法を用いて「LEF-1 陽性幹細胞」を単離・濃縮し、その性状を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、HDDPCs 由来 iPS 細胞へ LEF-1 プロモーター + 蛍光遺伝子 (EGFP cDNA) を内蔵するプラスミド (pTA-LEN) を遺伝子導入し、LEF-1 陽性幹細胞を遺伝子工学的に単離・濃縮する。さらに、単離した LEF-1 陽性幹細胞が多分化能性を有しているかを明らかにする。2 年間の研究の中で、1) pTA-LEN を HDDPCs 由来 iPS 細胞へ電気穿孔法により遺伝子導入させ、pTA-LEN 導入 iPS 細胞株を作製する、2) pTA-LEN 導入 iPS 細胞からの胚様体を *in vitro* で形成させる、3) 胚様体から EGFP、LEF-1 陽性幹細胞を単離・濃縮する、4) この EGFP、LEF-1 陽性幹細胞における幹細胞マーカー発現、多分化能性、造腫瘍抵抗性 (癌化のリスクがないこと) などを確認する。

4. 研究成果

(1) 脱落乳歯へ初期化 4 因子を遺伝子導入することで、HDDPCs 由来 iPS 細胞を作製した。得られた iPS 細胞は、多分化能を有することを免疫組織学的方法にて確認した。

(2) HDDPCs 由来 iPS 細胞へ LEF-1 プロモ

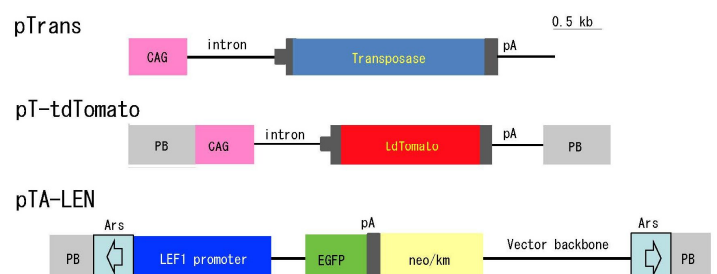


図 1 : プラスミドベクターの構造

ーター(図1)を配し、その下流にEGFP cDNAを組み込んだプラスミド(pTA-LEN)を遺伝子導入し、pTA-LEN導入iPS細胞の作製実験を行った。

本研究では、哺乳類細胞への遺伝子導入の効率が非常に高いとされる *piggyBac* 遺伝子導入系を用いる。図1に掲げるように、トランスポゾンベクターpTA-LENには、pTransベクターから発現される *piggyBac* transposase が結合する acceptor 部分(PB)、その内側にウニarylsulfatase(Ars)由来のインスレーター(遺伝子導入部位での染色体から受ける gene silencing を抑えるための構造体)、更にその内側に各遺伝子発現ユニットが搭載されている。pT-tdTomatoは *piggyBac* 系トランスポゾンで、赤蛍光を発し、遺伝子導入効率の判定、細胞のマーキングに用いた。

(3) HDDPCs 由来 iPS 細胞へ電氣的穿孔法を用いて pTA-LEN、pTrans、pT-tdTomato の3つのプラスミドを同時に遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、pT-tdTomato の赤蛍光を確認することはできた。しかし、EGFP の緑蛍光は確認することができなかった。また、薬剤選択を行うと薬剤耐性のフィーダー細胞が剥がれてしまい、多くの iPS 細胞が死滅してしまった。

本研究で使用する HDDPCs 由来 iPS 細胞を抗 LEF-1 抗体にて免疫組織学的に評価したところ、陰性であり、LEF-1 は iPS 細胞よりもやや分化が進んだレベルで発現すると考えられる。

(4) フィーダーフリーでの iPS 細胞培養に切り替え再実験を行ったが、pTA-LEN 導入 iPS 細胞を単離することはできなかった。今後、iPS 細胞への効率的な遺伝子導入技術が開発されることで、pTA-LEN 遺伝子導入 iPS 細胞の単離も可能となるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Soda M, Saitoh I, Murakami T, Inada E, Iwase Y, Noguchi H, Shibasaki S, Kurosawa M, Sawami T, Terunuma M, Kubota N, Terao Y, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M: Repeated human deciduous tooth-derived dental pulp cell reprogramming factor transfection yields multipotent intermediate cells with enhanced iPS cell formation capability. *Sci Rep*, 査読有, 9(1), 2019, DOI: 10.1038/s41598-018-37291-2.

Inada E, Saitoh I, Kubota N, Iwase Y, Murakami T, Sawami T, Yamasaki Y, Sato M: Increased Expression of Cell Surface SSEA-1 is Closely Associated with Naïve-Like Conversion from Human Deciduous Teeth Dental Pulp Cells-Derived iPS Cells. *Int J Mol Sci*, 査読有, 20(7), 2019, DOI: 10.3390/ijms20071651.

Murakami T, Saitoh I, Sato M, Inada E, Soda M, Oda M, Domon H, Iwase Y, Sawami T, Matsueda K, Terao Y, Ohshima H, Noguchi H, Hayasaki H: Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1 promoter-driven selection markers, *Arch Oral Biol*, 査読有, 81(1-2): 110-120, 2018, DOI: org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.033.

Sato M, Saitoh I, Murakami T, Kubota N, Nakamura S, Watanabe S, Inada E: Intrapacreatic parenchymal injection of cells as a novel tool for allowing a small number of proliferative cells to grow in vivo, *Int J Mol Sci*, 査読有, 18(8): 1678, 2017, DOI: 10.3390/ijms18081678.

〔学会発表〕(計3件)

稲田絵美, 齊藤一誠, 窪田直子, 村上智哉, 澤味 規, 松枝一成, 早崎治明, 山崎要一: 初期胚特異的糖鎖抗原 SSEA-1 は乳歯歯髓細胞由来 iPS 細胞の高度未分化状態を特定するマーカーとして有用である. 第 56 回日本小児歯科学会大会, 大阪市, 2018 年 5 月 10-11 日, 小児歯誌 56(2): 214 頁, 2018.

左右田美樹, 齊藤一誠, 村上智哉, 松枝一成, 岩瀬陽子, 澤味 規, 大島勇人, 早崎治明: リプログラミング因子の一過的強制発現は乳歯培養歯髓細胞の幹細胞化を誘導し、その多分化能を増強させる. 平成 29 年度新潟歯学会第 2 回例会, 新潟, 2017 年 11 月 11 日, 新潟歯学会誌 47(2):62 頁, 2017

稲田絵美, 齊藤一誠, 窪田直子, 村上智哉, 左右田 美樹, 澤味 規, 松枝一成, 早崎治明, 山崎要一: 遺伝子工学的的手法による不死化ヒト乳歯歯髓細胞株の樹立と特性解析. 第 55 回日本小児歯科学会大会, 北九州, 2017 年 5 月 25-26 日, 小児歯誌 55(2): 288 頁, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/pedo/pedo.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 齊藤 一誠

ローマ字氏名: SAITOH Issei

研究協力者氏名: 佐藤 正宏

ローマ字氏名: SATO Masahiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。