

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390563

研究課題名（和文）iPS細胞の臨床応用における歯科医療安全に関する基礎研究と安全性評価方法の検討

研究課題名（英文）Basic study to address safety issue of human iPS cells for dental practice

研究代表者

花田 信弘（HANADA NOBUHIRO）

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916

研究成果の概要（和文）：

歯根膜細胞は骨芽細胞やセメント芽細胞に分化するなど多分化能を持つ事が知られているので、iPS細胞のソースとして有望な細胞である。我々は歯根膜繊維芽細胞からiPS細胞の誘導に我が国で初めて成功した。樹立したiPS細胞の多分化能は確認できたが、多くの細胞で染色体の欠損（核型異常）が不規則に認められた。また、テラトーマには脂肪様組織、神経様組織、筋肉様組織、上皮および管空様組織、軟骨様組織が観察されたが、未熟な細胞も観察された。臨床研究に向けて今後とも分化能や安全性についての研究が必要である事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）： The periodontal ligament (PDL) fibroblasts have been suggested as multipotent cells. Periodontal ligament fibroblasts differentiate into osteoblasts and cementoblasts. We established HPDL-iPS cells from the human periodontal ligament (HPDL) fibroblasts. However, in this study, we observed several abnormal karyotype in HPDL-iPS cells. We also observed immature cells in the teratoma. Further study is necessary to clarify the propensity of HPDL-iPS cells to differentiate and to explore safety issues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	3,510,000	810,000	4,320,000
年度			
年度			
総計	14,910,000	4,230,000	19,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：iPS 細胞、歯根膜細胞、歯科医療安全

1. 研究開始当初の背景

(1) Induced pluripotent stem cell (iPS細胞)はES細胞のように分化多能性を持ち、ヒトES細胞が抱える倫理的問題や、免疫拒絶反応の課題をクリアできる細胞である。

(2) 細胞ソースには抜去された歯から非侵襲的に容易に採取・単離でき、セメント芽細胞や骨芽細胞にも分化する能力を持つ歯根膜細胞が最適である。

2. 研究の目的

Induced pluripotent stem cell (iPS)はES細胞のような倫理的問題が回避できること、患者自身の細胞から作製できるため、免疫拒絶が起こらないことなど再生医療に対し優れた面を持ち、再生医療のブレークスルーとなる可能性が大きく期待されている。

本研究では、ヒト歯周靭帯線維芽細胞とレトロウイルスベクターを用いて iPS 細胞を樹立し、その安全性を検討する。

3. 研究の方法

市販されている正常ヒト歯周靭帯線維芽細胞とレトロウイルスベクターを用いて iPS 細胞を樹立する。

その樹立方法は *Oct 3/4*, *SOX2*, *Lin 28*, *Klf 4*, *Nanog* の 4 つの遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入することによって ES 細胞様の形態を有する細胞にアルカリフォスファターゼ染色によりスクリーニングを行い、さらに幹細胞マーカの発現を遺伝子レベル、タンパクレベルで確認を行った。

4. 研究成果

我々は歯根膜細胞が multi potent である

性質を生かし、歯根膜繊維芽細胞から iPS 細胞の誘導に成功した (Nomura et al. Histochem Cell Biol. 2012 Feb 11)。樹立した iPS 細胞を SCID マウスの腹腔内に注入し、SCID マウスの腹腔内にテラトーマを形成させた (図 1 ~ 3)。



図 1 SCIDマウスの腹腔内に形成されたテラトーマ (a A teratoma (arrow) formed subcutaneously on the back of a SCID mouse)。

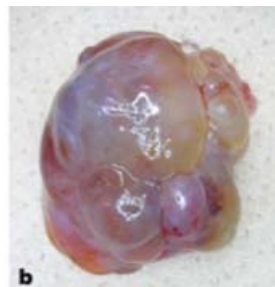


図 2 SCIDマウスの腹腔内に形成されたテラトーマ (b an extracted teratoma)。



図3 対照として用いた歯根膜細胞接種部位にはテラトーマは形成されていない (c no teratoma was found in the backs of SCID mice following injection of parental HPDLFs after 9 weeks)。

その結果、脂肪様組織、神経様組織、筋肉様組織、上皮および管空様組織、軟骨様組織が観察され、テラトーマの形成が確認された(図4～8)。歯根膜繊維芽細胞から樹立した細胞は分化多能性を持つiPS細胞であることが確認できた。

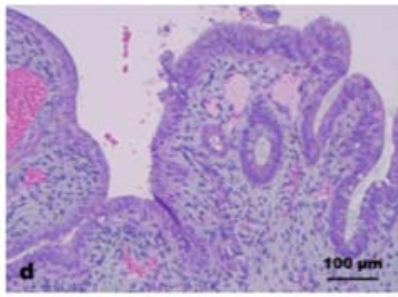


図4 テラトーマの腸管様組織 (内胚葉)

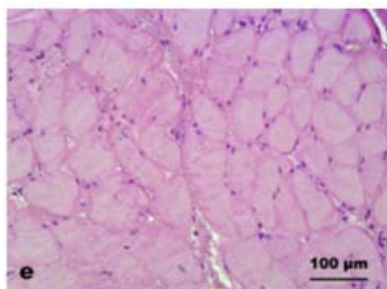


図5 テラトーマの脂肪組織 (中胚葉)

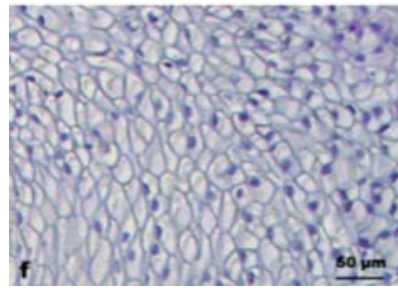


図6 テラトーマの筋組織 (中胚葉)

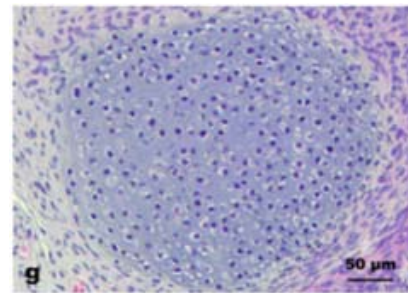


図7 テラトーマの軟骨様組織 (中胚葉)

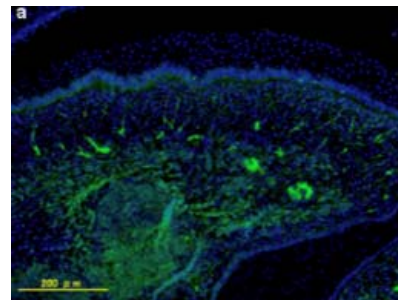


図8 テラトーマの神経組織 (外胚葉)
Neural tissues (ectoderm). モノクローナル抗体 PGP9.5で染色 (general marker protein of neurons).

iPS細胞をSCIDマウスの腹腔内に注入し、SCIDマウスの腹腔内に生じたテラトーマには、形成典型的な組織像の他、未熟な組織が多数観察された。具体的には未熟な間質をはじめ、未熟な軟骨および分化傾向不明の腺管構造、やや未熟で粘液腫様の間質、胎児組織に類似した粘液腫様の間質、未熟な腸管構造、分化が明かでない腺上皮と分化が不明な胎児性組

織の構造などが多数観察された。また、iPS細胞の核型を精査したところ、多くの細胞で染色体の欠損（核型異常）が不規則に認められた（図9）。

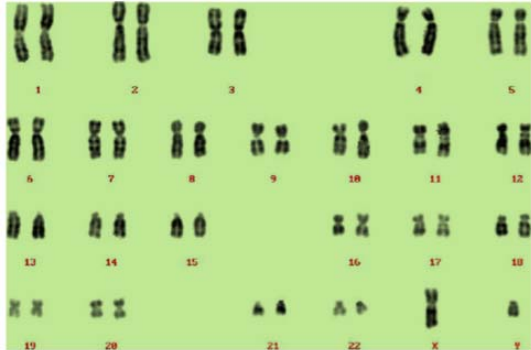


図9 HPDL-iPS細胞の核型異常。

このような観察結果から、iPS細胞を特定組織に分化させるか、そのまま生体内に注入し組織形成を誘導しようとした場合、未熟な細胞、組織から異常な組織が形成される可能性が示唆された。

また、核型異常を示す細胞が一定の細胞や組織に分化する可能性があるため、今後は特定の細胞に分化させた後にSCIDマウスをはじめとする生体内への移植によって未熟な細胞、組織形成、さらに核型異常を精査する必要がある。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

Nomura Y, Ishikawa M, Yashiro Y, Sanggarnjanavanich S, Yamaguchi T, Arai C, Noda K, Takano Y, Nakamura Y, Hanada N. Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2012

〔学会発表〕（計3件）

(1) 第53回歯科基礎医学会総会、岐阜市、*Journal of Oral Biosciences* 53巻Suppl.

Page152 (2011.09)、ヒト歯根膜線維芽細胞からのiPS細胞の樹立Author:石川美佐緒, 野村義明, 八城祐一, 新井千博, 山口貴央, 村田貴俊, 野田晃司, 石川雄一, 花田信弘, 中村芳樹

(2) 第60回日本口腔衛生学会総会、松戸市、口腔衛生学会雑誌 61巻4号 Page481 (2011.08) iPS細胞の安全性に関する検討、野村義明, 石川美佐緒, 新井千博, 八城祐一, 野田晃司, 山口貴央, 阿保備子, 角田衣理加, 山田秀則, 今井奨, 中村芳樹, 花田信弘

(3) 第61回日本口腔衛生学会総会、横須賀市、口腔衛生学会雑誌 62巻2号 Page245 (2012.04) iPS細胞の安全性に関する検討第2報 核型異常について、野村義明, 石川美佐緒, 新井千博, 八城祐一, 野田晃司, 山口貴央, 阿保備子, 角田衣理加, 山田秀則, 今井奨, 中村芳樹, 花田信弘

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花田 信弘 (HANADA NOBUHIRO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：70180916

(2) 研究分担者

野村 義明 (NOMURA YOSHIAKI)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：90350587

今井 奨 (IMAI SUSUMU)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：80072958

中村 芳樹 (NAKAMURA YOSHIKI)
鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70097321

山根 明 (YAMANE AKIRA)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20166763

佐藤 慶太 (SATO KEITA)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：00280975

(3)連携研究者

なし