

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10165

研究課題名(和文) 歯の再生を目指したヒト乳歯歯髄幹細胞濃縮と機能解析

研究課題名(英文) Enrichment and functional analysis of human deciduous dental pulp stem cells for tooth regeneration

研究代表者

稲田 絵美 (Inada, Emi)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：30448568

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)：限界希釈法にてヒト乳歯歯髄細胞(HDDPC)をsingle cell化した後、幹細胞特異的遺伝子の発現をRT-PCR法にて調べた結果、cell cloneによってアルカリホスファターゼ(ALP)等の幹細胞特異的遺伝子の発現様式が異なることが判った。さらに、HDDPCへの山中因子の繰り返し遺伝子導入による幹細胞様細胞への分化転換誘導実験の結果、4回目の遺伝子導入でALP陽性細胞の出現を確認できたことから、HDDPCから幹細胞様細胞への誘導が成功したと考えられる。一方、HDDPC由来iPS細胞の高度未分化誘導、続く、胚様体形成後、独自の器官培養の結果、三胚葉性の高度に分化した細胞の発生を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療では、自己再生能と分化能を有する幹細胞が重要な役割を果たす。脱落乳歯や智歯、矯正治療のために便宜的に抜歯される永久歯から採取される歯髄細胞は、組織再生のための有望な細胞ソースと考えられている。本研究により、ALP(+HDDPC)が多能性幹細胞の特性を有し、それが歯形成に関与する能力が歯組織再構成実験から証明されれば、歯学分野、その他の基礎研究分野への波及効果は大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：Human deciduous dental pulp cells (HDDPC) were prepared as single cells by a limiting dilution method, and the expression of stem cell-specific genes was examined by RT-PCR. The results showed that the expression patterns of stem cell-specific genes such as alkaline phosphatase (ALP) differed among the cell clones tested. Furthermore, when we performed repeated gene transfer of Yamanaka's factors into HDDPC to generate stem cell-like cells, just prior to iPS cell formation, there observed the presence of ALP-positive cells after the fourth gene transfer. This suggests that HDDPC can be induced to generate stem cell-like cells. On the other hand, we successfully obtained a cell mass with 3-D structure comprised by highly differentiated cells, when naive iPS cells are induced to form embryoid bodies (EBs) and these EBs were subjected to organ culture system which had been developed in-house.

研究分野：小児歯科

キーワード：遺伝子工学的的手法 アルカリホスファターゼ ヒト乳歯歯髄細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療には、自己増殖能と分化能を有する幹細胞が必要である。幹細胞は胚性幹細胞 (embryonic stem cells ; 以下、ESC)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; 以下、iPSC)、体性幹細胞 (somatic stem cell ; 以下、SSC) に大別される。ESC、iPSC は高度な多分化能を有するが、いずれも移植後の潜在的な腫瘍化の可能性があり、また、ESC は倫理的問題を孕む。一方、SSC は体細胞で構成される組織内に存在し、潜在的な腫瘍化もなく、且つ、ESC、iPSC に較べれば、分化能は概ね限定的である。例えば、骨髄由来の間葉系幹細胞は、*in vitro* での扱いが手軽で、表面抗原を指標とした FACS 等で簡単に単離できる。そして、何よりも当該細胞は再生医療現場で多用されている。他方、ヒト乳歯歯髄細胞 (HDDPC) は交換期の 6 ~ 12 歳の患者から簡単に入手でき、高い増殖能と多分化能を有し、組織再生の有望な細胞と考えられる。しかし、他の非幹細胞も混在する細胞集団であるため、この中から幹細胞を純化する必要がある。

2. 研究の目的

申請者らはこれまで、ESC、iPSC、SSC に強発現するアルカリフォスファターゼ (ALP) は、増殖性の高い HDDPC でも強発現する、当該細胞では、幹細胞特異的遺伝子 OCT3/4、SOX2、NANOG の発現も高い、しかも、山中 4 因子導入により容易に iPSC 化される、等の点を見出した¹⁾。特に、「OCT3/4 発現は ALP 活性が高い細胞にのみ認められた」ことから、ALP 高活性かつ OCT3/4 陽性の細胞 (以下、ALP(+)/OCT3/4(+)) と表記) は有望な SSC と考えた。これを踏まえ、本研究では、HDDPC から ALP(+)/OCT3/4(+) 細胞を細胞工学的手法を用いて単離・濃縮し、その特性や生物学的機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では HDDPC 由来 SSC を再生医療 (特に歯再生) に応用することを最終目標に据え、ALP(+) 細胞 (以下、HDDPC-ALP(+)) の単離、細胞工学的手法を用いた HDDPC 由来 ALP(+)/OCT3/4(+) 細胞 (以下、HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+)) の単離、単離株の特性解析 (遺伝子発現様式、多分化能性等)、単離株の機能解析 (マウス胎仔由来歯槽堤細胞との共培養による *in vitro* 組織再構成実験) を通じ、HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+) の実体を明らかにする。

(1) HDDPC-ALP(+)) の選別 :

患者の交換期乳歯から取得した初代培養 HDDPC に対し、Alkaline Phosphatase Live Stain (Invitrogen) を用いて非侵襲的な ALP 染色を施す。蛍光細胞を FACS にて HDDPC-ALP(+) として選別・回収。これを培養にて増殖させる。細胞の一部は、ALP 活性検出キットにて ALP 発現を確認すると共に、免疫染色により OCT3/4 発現の確認も行う。

(2) HDDPC-ALP(+)) の不死化と HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+)) の樹立 :

HDDPC-ALP(+) に piggyBac トランスポゾン (PB) にヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子発現ユニットを組み込んだ不死化用ベクター pT-hTERT を遺伝子導入する。さらに、マウス Oct-3/4 promoter の下流に EGFP (緑蛍光蛋白) cDNA + poly(A) 付加部位 + neomycin 耐性遺伝子発現ユニット (*neo*) を配した PB 系ベクター pT-dOEN も同時に遺伝子導入する。さらに、細胞移植時、移植細胞の所在を示すマーカー tdTomato (赤蛍光遺伝子) を搭載した PB 系ベクター pT-tdTomato も導入する。遺伝子導入後、neomycin analogue G418 を含む培地で細胞を選別する。生じた薬剤耐性コロニーの内、緑/赤蛍光発現コロニー (OCT3/4 発現細胞と目される) を拾い、正常培地にて展開させる。最終的に、HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+) 株を得る。

(3) HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+)) の特性解析 :

HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+) に分化誘導剤を与え、神経や骨細胞等の分化細胞へ *in vitro* で分化誘導できるかその是非を検討する (多分化能性解析)。一方、免疫染色や RT-PCR 法にて他の幹細胞特異的マーカー SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、NANOG、SOX2、REX1 の発現についても検討する (幹細胞性解析)。

(4) HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+)) とマウス胎仔歯槽堤細胞の共培養による組織再構成実験 :

過去の報告では、器官原基の自律的形成には間葉系幹細胞が必須であり、マウス胎仔由来細胞との共培養 (器官培養) で脾臓、肺、心臓等の様々な器官原基を 3-D 構造として再構築できるとされている。本申請では、HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+) とマウス胎仔歯槽堤部由来細胞との混和による器官培養により、歯原基の再構成を試みる。実験群は左記の細胞を混和したもの、対照群では、歯槽堤部由来細胞のみとし、各々、 5×10^8 個/mL の高密度懸濁液を作製する。これを高粘性 0.3 mg/mL コラーゲン液中に包埋し、このドロップを 3 μ m 孔径の isopore membrane filter (Merck Millipore) の上に載せ、その filter を 24-well plate 内の培地 (1.5 mL) に浮かべ、器官培養とする。その後、歯牙様構造物形成の有無を両群で比較する。

4. 研究成果

(1) HDDPC 単一細胞 cloning と HDDPC-ALP(+) の特性解析:

当初、HDDPC に Alkaline Phosphatase Live Stain を用いて ALP 染色を施したが、蛍光細胞の取得は困難だった。そこで、限界希釈法にて HDDPC を単一細胞化した後、増殖させる試みを行った。その結果、単一細胞化はできたものの、細胞増殖速度は clone 間で差があること、一時的に増殖しても、継続的な細胞拡大は困難であることが判った。36 clone がわずかに増殖したため、ALP 発現の有無を組織化学的に検索した結果、ALP 強発現は 8%、ALP 弱発現は 22%、ALP 無発現は 70% だった。また、Whole Transcriptome Analysis (WTA) を用いて幹細胞特異的遺伝子発現を RT-PCR 法にて調べた結果、clone によって上記遺伝子群の発現様式が異なることが判った (図 1)。

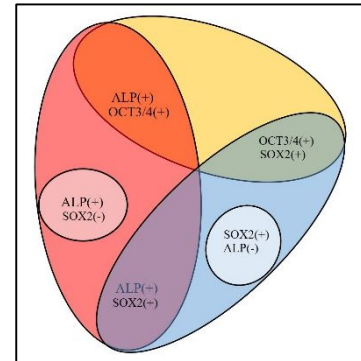


図 1: HDDPC における幹細胞特異的遺伝子の発現パターン

(2) HDDPC の幹細胞様細胞への分化転換誘導:

これまでの実験で、HDDPC 内に含まれる ALP(+)細胞は少ないこと、また、単一細胞 cloning は困難だったことから、HDDPC を幹細胞様細胞に分化転換誘導する実験も並行して進めた。分化細胞に OCT3/4 を強制発現させた場合、当該細胞は幹細胞様細胞へ分化転換誘導され、その結果、幹細胞様細胞は OCT3/4 などの幹細胞マーカーを発現するようになると期待される。OCT3/4 は他の幹細胞マーカー発現を誘導する「マスター遺伝子」と目されるため、幹細胞様細胞は OCT3/4 以外にも ALP、SOX2 などの幹細胞マーカーも発現するようになると考えられる。本研究では、OCT3/4 タンパクを細胞内で一過的に過剰発現させる目的で、HDDPC に山中因子を繰り返し遺伝子導入した。その結果、4 回目の遺伝子導入で ALP(+)細胞を確認することができた。今後、ALP(+)細胞の中から HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+)を選別する試みも進める。

(3) 新規器官培養系の確立:

新規器官培養系確立を目指し、先ず、細胞増殖の足場となる scaffold として VitroGel と Matrigel を採用し、その中に EGFP 蛍光発現マウス B16 melanoma 細胞 (5×10^8 個/mL) を投じ、60 μ L 容積のドロップを作製した。このドロップを 3 μ m 孔径の isopore membrane filter (Merck Millipore) に載せ、その filter を 30-mm dish 内の培地 (3 mL) 上に浮かべ、器官培養した。その結果、VitroGel では細胞が scaffold 周辺部に広がったが、Matrigel では scaffold 中心部に細胞が集まり、増殖・拡大が認められた。以上から、Matrigel が *in vitro* での細胞の 3-D 構造構築に有効な素材だと判断された。

HDDPC 由来 iPS 細胞と同 iPS 細胞から作製した胚様体を Matrigel に包埋し、器官培養した結果、培養 21 日で内部での細胞増殖・拡大を認めた。両者の凍結切片を作製し、H-E 染色したところ、iPS 細胞由来の組織切片内には、分化程度は低いが、三胚葉性の分化細胞を認めた。他方、胚様体由来の組織切片内にはより高度に分化した三胚葉性の分化細胞を認めた (図 2)。

今後、上記培養条件を用い、HDDPC-ALP(+)/OCT3/4(+) とマウス胎仔由来細胞の共培養実験を進める予定である。

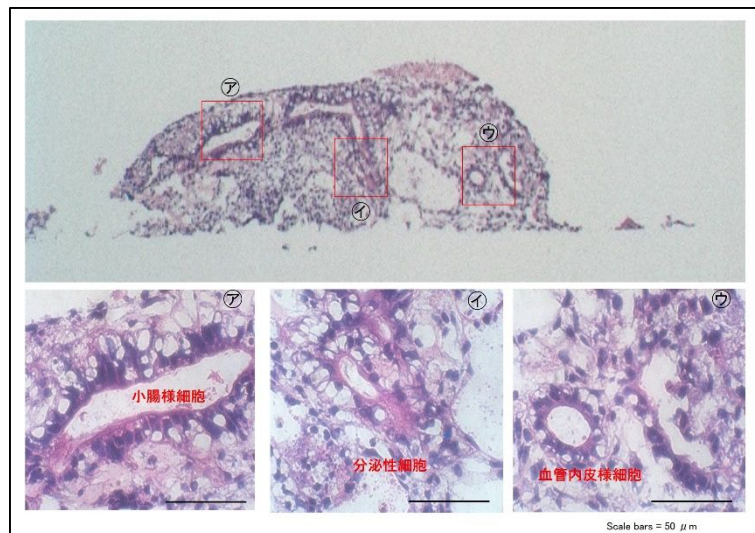


図 2: HDDPC 由来 iPS 細胞から発した胚様体を器官培養した 3-D 構造体の HE 染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ibano N, Inada E, Otake S, Kiyokawa Y, Sakata K, Sato M, Kubota N, Noguchi H, Iwase Y, Murakami T, Sawami T, Kakihara Y, Maeda T, Terunuma M, Terao Y, Saitoh I | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 The Role of Genetically Modified Human Feeder Cells in Maintaining the Integrity of Primary Cultured Human Deciduous Dental Pulp Cells. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine | 6. 最初と最後の頁 6087 ~ 6087 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11206087 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Sato M, Saitoh I, Kiyokawa Y, Akasaka E, Nakamura S, Watanabe S, Inada E | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Electroporation-Based Non-Viral Gene Delivery to Adipose Tissue in Mice. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 OBM Genetics | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 1 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2202151 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Sato M, Ohtsuka M, Inada E, Nakamura S, Saitoh I, Takabayashi S | 4. 巻 CRISPR Technology |
| 2. 論文標題 Recent advances in in vivo genome editing targeting mammalian preimplantation embryos. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 InTechOpen | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 42 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.106873 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Miyagasako R, Hansol J, Watanabe S, Miyoshi K, Inada E, Sato M | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Cytoplasmic microinjection of piggyBac transposase mRNA and transposon vectors for efficient in vitro production of transgenic porcine parthenotes. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 OBM Genetics | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 20 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2203166 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Inada E, Saitoh I, Kubota N, Iwase Y, Kiyokawa Y, Noguchi H, Yamasaki Y, Sato M | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 RNA analysis based on a small number of manually isolated fixed cells (RNA-snMIFxC) to profile stem cells from human deciduous tooth-derived dental pulp cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biological Procedures Online | 6. 最初と最後の頁 12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12575-021-00149-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Sato M, Saitoh I, Akasaka E, Inada E | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Development of a novel, pipette tip-aided cell cloning method for effective isolation of genome-edited porcine cell | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 OBM Genetics | 6. 最初と最後の頁 2101126 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2101126 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Saitoh I, Sato M, Kiyokawa Y, Inada E, Iwase Y, Ibano N, Noguchi H | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Induced Tissue-Specific Stem Cells (iTSCs): Their Generation and Possible Use in Regenerative Medicine | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pharmaceutics | 6. 最初と最後の頁 780 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13060780 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Sato M, Saitoh I, Kiyokawa Y, Iwase Y, Kubota N, Ibano N, Noguchi H, Yamasaki Y, Inada E | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase, a Possible Mediator of Cell Maturation: Towards a New Paradigm | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 3338 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123338 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Nakamura Shingo, Inada Emi, Saitoh Issei, Sato Masahiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Recent Genome-Editing Approaches toward Post-Implanted Fetuses in Mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 BioTech | 6. 最初と最後の頁 37～37 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biotech12020037 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakamura Shingo, Morohoshi Kazunori, Inada Emi, Sato Yoko, Watanabe Satoshi, Saitoh Issei, Sato Masahiro | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Recent Advances in In Vivo Somatic Cell Gene Modification in Newborn Pups | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 15301～15301 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242015301 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Sato Masahiro, Morohoshi Kazunori, Ohtsuka Masato, Takabayashi Shuji, Inada Emi, Saitoh Issei, Watanabe Satoshi, Nakamura Shingo | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Recent Advances in the Production of Genome-Edited Animals Using <i>iPSCs</i>-GONAD, a Novel <i>in vivo</i> Genome Editing System, and Its Possible Use for the Study of Female Reproductive Systems | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 OBM Genetics | 6. 最初と最後の頁 1～30 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2304207 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 稲田絵美, 齊藤一誠, 清川裕貴, 井葉野夏実, 山崎要一, 佐藤正宏 |
| 2. 発表標題 新規器官培養系の構築 歯系細胞由来3D構築体作製に向けた予備実験 |
| 3. 学会等名 第61回日本小児歯科学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井葉野夏実, 清川裕貴, 坂田健輔, 稲田絵美, 大竹慎司, 村上智哉, 澤味 規, 岩瀬陽子, 齊藤 一誠 |
| 2. 発表標題 乳歯歯髄細胞への高効率な遺伝子導入条件の検討と多機能feeder細胞の樹立 |
| 3. 学会等名 第61回日本小児歯科学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 清川裕貴, 稲田絵美, 井葉野夏実, 安村真一, 岡野 哲, 岩瀬陽子, 早崎治明, 齊藤一誠 |
| 2. 発表標題 糖尿病患児由来乳歯歯髄細胞を用いた膵臓特異的幹細胞(T1D-iTSC-P)の樹立 |
| 3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 佐藤 正宏 (Sato Masahiro) (30287099) | 国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・共同研究員 (82612) | |
| 研究分担者 | 齊藤 一誠 (Saitoh Issei) (90404540) | 朝日大学・歯学部・教授 (33703) | |
| 研究分担者 | 野口 洋文 (Noguchi Hirohumi) (50378733) | 琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|