

## 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25年5月10日現在

機関番号：13701  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592181  
 研究課題名（和文） 動物由来物質・因子を使わない安全なヒト歯髄由来幹細胞の樹立と iPS 細胞化の検討  
 研究課題名（英文） Establishment of an animal-free systems for human dental pulp-derived stem cell culture and induction of iPS cells  
 研究代表者  
 川口 知子（KAWAGUCHI TOMOKO）  
 岐阜大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：30509815

研究成果の概要（和文）：これまで我々が樹立したヒト歯髄組織幹細胞（Dental Pulp Stem Cell: DPSC）は、ウシ血清が含まれた培地で培養していた。そのためウシ血清由来のプリオンや外来微生物による汚染は否定できなかった。今回、動物由来物質・因子を使わない条件（アニマルフリー）を模索して安全な DPSC を樹立した。DPSC の初代コロニー形成は、血清含有培地のほうが優れていたが、樹立後は、アニマルフリーでの培養、保存および iPS 細胞への誘導が可能であった。

研究成果の概要（英文）：Human dental pulp stem cell (DPSC) lines are usually established in the medium containing fetal bovine serum (FBS). FBS is an important additive for cell growth, however, the allergenic potential and the possibility of contamination can not be excluded. In this study, we established DPSCs with two kinds of medium: 1) medium containing FBS or 2) serum-free medium. DPSCs grown under the condition containing FBS, showed significantly higher primary colony formation than those under serum-free condition. But once established, serum-free condition was applicable for culture, preservation and iPS cells induction.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 「智歯歯胚からの組織幹細胞の樹立と分化・増殖能の評価」(2006-7年度、萌芽研究)の支援を受け、抜歯後の智歯より種々の形成段階にある歯髄組織幹細胞(Dental Pulp Stem Cell: DPSC)を200ライン樹立・

保有し、個体差の検証を行った。その結果、より未熟な形成期の歯髄から得られる DPSC は高い増殖能・分化能(ステムネス性：幹細胞性)を持つが、継代培養により喪失すること(Takeda et al. J Dent Res. 2008)を示した。

(2) 「ヒト歯髄組織幹細胞の樹立効率向上と iPS 細胞化の検討」(2008-9 年度、若手研究(スタートアップ))の支援を受け、智歯由来 DPSC は、低酸素・低密度で培養することでコロニー形成能・増殖能が増強することを明らかにし、今まで樹立が困難であった高齢者からの DPSC の樹立効率を向上させた (Iida et al. Arch. Oral Biol. 2010)。更には、京都大学山中研究室と共同で、智歯由来 DPSC から iPS 細胞誘導を試み、iPS 細胞様のコロニーを得て、DPSC が iPS 細胞の源として活用可能であることが示している (Tamaoki et al. J Dent Res. 2010)。

## 2. 研究の目的

我々が保有する DPSC を用いて、iPS 細胞の今後の大きな課題である個体差の検討、樹立効率の検証を行う。また従来、研究に用いる培地にはウシ血清が添加されているが、ウシ血清は、プリオンや病原性ウイルス等が存在する危険性などの問題がある。このような問題を回避するために無血清培地についてはアニマルフリーの研究が必要である。そこで、より安全な DPSC を得るために動物由来の物質・因子をつかわないアニマルフリーでの DPSC の樹立法を確立することで、再生医療に活用可能な医療資源の開拓を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 岐阜大学医学部附属病院にてインフォームド・コンセントを得て抜歯された智歯より間葉系幹細胞-血清含有培地 (MSCGM) および無血清培地 (MSCGM-CD) を用いて DPSC を樹立する。そしてコロニー形成率、細胞増殖速度および分化能を解析する。また遺伝子発現を DNA array を用いて比較する。

(2) MSCGM および MSCGM-CD を用いて樹立した DPSC にセンダイウィルスベクターに組みこんだ山中 4 因子 (SOX2・OCT3/4・KLF4・c-MYC) を導入し、iPS 細胞を誘導する。センダイウィルス感染 6 日後に、DPSC をフィーダー細胞 (SNL) 上に播種し、7 日後以降は ES 細胞用培地 (Primate ES medium) にて培養を行う。感染 21 日目にコロニー数を計測し、性状解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) アニマルフリー条件下での DPSC 樹立初代培養のコロニー形成率は無血清培地

(MSCGM-CD) と比較して血清含有培地 (MSCGM) で有意に高かった。しかし、長期継代培養では、どちらも高い増殖能を示し、分化能も維持されていた。

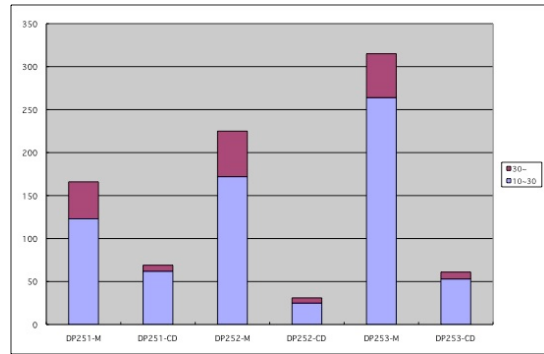


図1 初代培養時のコロニー形成率

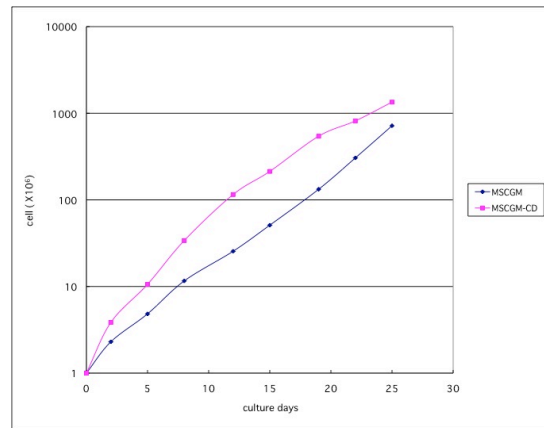


図2 細胞増殖率

(2) アニマルフリー条件下で樹立した DPSC からの iPS 細胞の樹立

MSCGM-CD 培養条件下でも iPS 細胞は樹立可能であった。また iPS 細胞の樹立効率に有意な差はみられなかった。

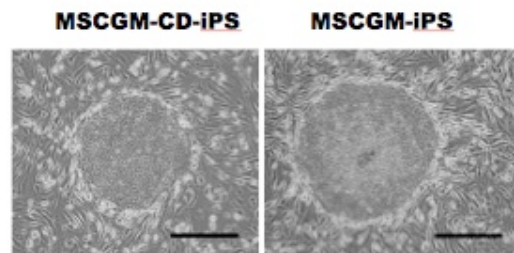


図3 アニマルフリー条件下で誘導された iPS 細胞

(3) アニマルフリー条件下で樹立した iPS 細胞の性状解析

MSCGM-CD 培養条件で誘導した iPS 細胞は、

ヒト ES 細胞様の細胞形態で ALP 染色にて陽性を認めた。また免疫染色にて ES 細胞の未分化マーカー (SSEA-4, TRA1-60, TRA1-80) 陽性、分化マーカー (SSEA-1) 陰性であった。また real-time-PCR 法で比較したところ、未分化マーカーはヒト ES 細胞と同程度の発現であった。さらにヌードマウスの精巣に移植したところ、テラトーマが形成され、三胚葉への分化能を有していた。MSCGM-CD 培養条件で誘導した iPS 細胞はヒト ES 細胞や MSCGM 培養条件下で誘導した iPS 細胞と同等の未分化性と多分化能を有することがわかった。

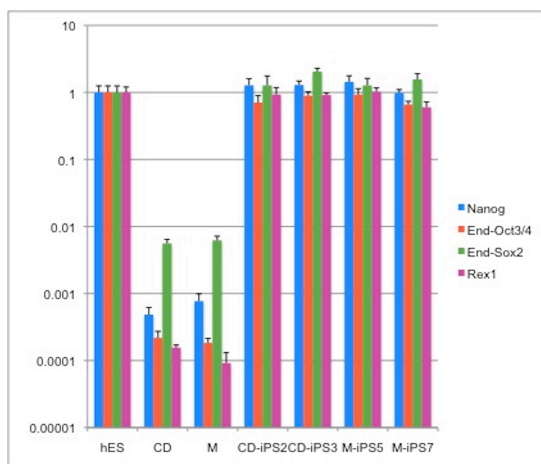


図4 real time PCR による未分化マーカー発現量の比較

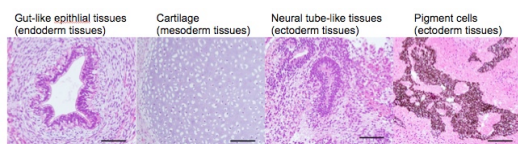


図5 テラトーマ形成による三胚葉分化

## 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)

① Gou Kawai, Takatoshi Ohno, Tomoko Kawaguchi, Katsuji Shimizu, Human Dental Pulp Facilitates Bone Regeneration in a Rat Bone Defect Model, Bone and Tissue Regeneration Insights, 査読有, 2013, 4; 1-10 doi: 10.4137/BTRL.S10687

〔学会発表〕 (計 7 件)

① 川口知子、柴田敏之、手塚建一他：動物由来物質・因子を使わない安全なヒト歯髓由来細胞の樹立と iPS 細胞誘導；第 12

回日本再生医療学会総会；2013 年 3 月 22 日；横浜

② 飯田一規、川口知子、柴田敏之他：ヒト歯髓細胞の樹立・iPS 細胞化に有用な低酸素培養システム；第 66 回日本口腔科学会総会；2012 年 5 月 18 日；広島

③ 飯田一規、川口知子、柴田敏之他：ヒト歯髓細胞の樹立・iPS 細胞化に及ぼす低酸素の影響；第 56 回日本口腔外科学会総会；2011 年 10 月 21 日；大阪

④ 玉置也剛、川口知子、柴田敏之他：ヒト歯髓細胞からのゲノムへの遺伝子挿入のない iPS 細胞に誘導；第 65 回日本口腔科学会総会；2011 年 4 月 21 日；東京

⑤ 川口知子、飯田一規、柴田敏之他：ヒト歯髓細胞に関する検討 1 ヒト歯髓由来細胞の発生段階と長期培養におけるステムネス性の変化；第 64 回日本口腔科学会総会；2010 年 6 月 25 日；札幌

⑥ 飯田一規、川口知子、柴田敏之他：ヒト歯髓細胞に関する検討 2 低酸素培養による高齢者からの効率的な歯髓細胞の採取とステムネス性の維持；第 64 回日本口腔科学会総会；2010 年 6 月 25 日；札幌

⑦ 玉置也剛、川口知子、柴田敏之他：ヒト歯髓細胞に関する検討 3 iPS 細胞バンクのリソースとしてのヒト歯髓細胞の有用性；第 64 回日本口腔科学会総会；2010 年 6 月 25 日；札幌

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：EFFICIENT METHOD FOR ESTABLISHING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

発明者：Tezuka Kenichi, Kawaguchi Tomoko, Kunisada Takahiro et al

権利者：岐阜大学、京都大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2008/068320

出願年月日：2012 年 10 月 2 日

国内外の別：海外

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 知子 (KAWAGUCHI TOMOKO)  
岐阜大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：30509815

### (2) 研究分担者

柴田 敏之 (SHIBATA TOSHIYUKI)  
岐阜大学・医学（系）研究科・教授  
研究者番号：50226172

牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)  
岐阜大学・医学（系）研究科・講師  
研究者番号：50345790

畠山 大二郎 (HATAKEYAMA DAIJIRO)  
岐阜大学・医学（系）研究科・助教  
研究者番号：60377653

### (3) 連携研究者

なし