

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792364

研究課題名(和文) バイオリサイクルを考慮した過剰埋伏歯由来 iPS 細胞の樹立効率の検討

研究課題名(英文) Established efficiency of iPS cells derived from impacted supernumerary tooth considering bio-recycle

研究代表者

齊藤 陽子 (SAITO YOKO)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30404487

## 研究成果の概要(和文)：

一般的に ES 細胞/iPS 細胞の樹立・維持には feeder 細胞が必要とされる。MEFs 細胞と STO 細胞は広く feeder 細胞として使用されている。本研究の目的は、ヒト乳歯 (HDDPCs) と過剰歯 (SNT) から iPS 細胞を樹立することである。HDDPCs と SNT 歯髄から初代培養細胞を得て、OCT3/4、SOX2/KLF4、LMYC/LIN28 (マーカーとして pmaxGFP を使用) を Neon® Transfection system を使用して遺伝子導入した。ES 培地にて 15 日間培養し、mitomycin C 処理した MEFs 細胞と STO 細胞上に播種した。コロニーは 26 継代まで培養維持した。この期間において、ES 細胞様形態を有しているかどうか、またアルカリフォスファターゼ活性があるかどうかを評価した。HDDPCs 由来 iPS 細胞では、MEFs 細胞上では樹立・維持が可能であったが、STO 細胞上では維持ができなかった。本結果から、HDDPCs は初期化因子により初期することができ、STO 細胞よりも MEFs 細胞の方が、HDDPCs 由来 iPS 細胞の樹立・維持には良いことが示唆され、feeder 細胞の選択は、効果的な iPS 細胞の樹立に重要な要素であることが示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

Feeder cells are generally required for establishing and maintaining embryonic stem (ES) cells/inducible pluripotent stem (iPS) cells. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) isolated from fetuses and STO mouse stromal cell line are the most widely used cells for this purpose. The aim of this study was to determine which cells are suitable for establishing iPS cells from human deciduous tooth dental pulp cells (HDDPCs) and supernumerary teeth (SNT). Primarily cultured HDDPCs and SNT ( $5 \times 10^4$ ) were co-transfected with 3 plasmids containing human OCT3/4, SOX2/KLF4, or LMYC/LIN28 together with pmaxGFP (used as a reporter) by using the Neon® Transfection system, a novel electroporation method involving a capillary and wire-type electrode. They were then cultured in a medium specified for maintaining ES cells for 15 days. Colonies were collected by trypsinization and re-seeded onto mitomycin C-treated MEFs or STO cells. The colonies were serially passaged for up to 26 passages. During this period, colony morphology was assessed to determine whether they exhibit ES-like morphology and alkaline phosphatase activity to evaluate the state of HDDPC reprogramming. HDDPCs maintained on MEFs were transformed to iPS cells with several undifferentiated properties, but those on STO cells failed. Established HDDPC-derived iPS cells grown on MEFs were successfully maintained on STO cells without loss of their pluripotent nature. Our results indicate that HDDPCs can be reprogrammed using reprogramming factor, and that MEFs are better than STO cells as feeder cells for establishing and maintaining HDDPC-derived iPS cells, suggesting that the choice of feeders is a key factors enabling efficient generation of iPS cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学

### 1. 研究開始当初の背景

近年の再生医療技術の進歩は目覚ましい。再生医療は、損傷を受けた組織や臓器を自らの体内にある細胞を用いてその機能や形態を回復しようという、最先端治療の確立を目指している。そのためには、各種の細胞・臓器へと再生が可能な幹細胞の制御や、自在に移植用細胞を生み出す技術が必要である。従来の幹細胞研究の問題点の多くを解決できる多能性幹細胞（以下 iPS 細胞）は 2006 年に高橋と山中によって樹立され、それ以降さまざまな体細胞から作成されている。

### 2. 研究の目的

歯科臨床においては、永久歯の萌出障害などの理由により過剰埋伏歯を摘出する機会があるが、これらの歯は自家移植等で有効活用されることは稀で、ほとんどが廃棄される。また、過剰埋伏歯を有する患者では先天欠如歯を併発する傾向があり、摘出した埋伏過剰歯を基に新たな歯を再生させることは非常に意義がある。歯髄には未分化な細胞集団が多数含まれていることから、これまで注目されることがなかった過剰埋伏歯も、バイオリサイクルという観点からみると、非常に有効な細胞供給源となる可能性がある。そこで本研究では過剰埋伏歯から iPS 細胞を樹立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

プラスミドにより遺伝導入を行うため、安全性を考慮してヒト由来の OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC のプラスミドを増幅する。過剰埋伏歯の歯髄細胞へプラスミドを用いて遺伝子を導入し、ヒト iPS 細胞を樹立する。未分化の程度が多様であることからシングルセルクローニングを行う。樹立した iPS 細胞が真の iPS 細胞であるかどうかを検査するために、未分化マーカー遺伝子の発現を解析する。三胚葉性に分化可能であることを確認し、誘導効率について検討する。

### 4. 研究成果

(1) 本研究の目的は、ヒト乳歯 (HDDPCs) と過剰歯 (SNT) から iPS 細胞を樹立することであるため、HDDPCs と SNT 歯髄から初代培養細胞を得て、OCT3/4、SOX2/KLF4、LMYC/LIN28 (マーカーとして pmaxGFP を使用) を Neon® Transfection system を使用して遺伝子導入した。

(2) ES 培地にて 15 日間培養し、mitomycin C 処理した MEFs 細胞と STO 細胞上に播種した (図 1・図 2)。コロニーは 26 継代まで培養維持した。

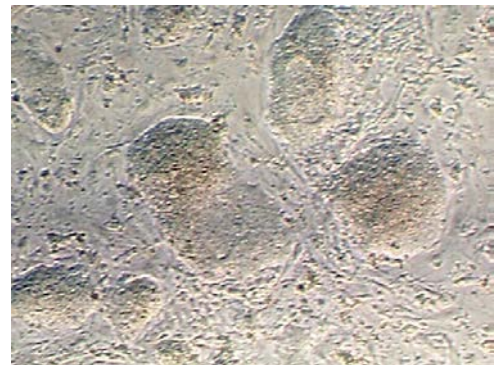


図 1 培養された iPS 細胞

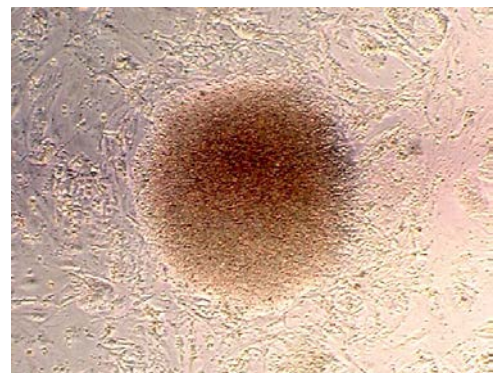


図 2 iPS 細胞 (拡大写真)

(3) 培養された iPS 細胞が ES 細胞様形態を有しているかどうか、またアルカリフォスファターゼ活性があるかどうかを評価した (図3)。

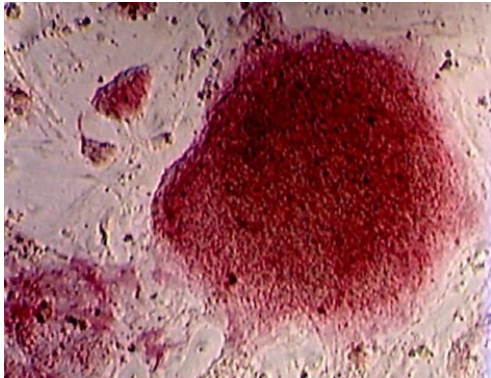


図3 アルカリフォスファターゼ活性

(4) HDDPCs 由来 iPS 細胞では、MEFs 細胞上では樹立・維持が可能であったが、STO 細胞上では維持ができなかった。

(5) 以上より、HDDPCs は初期化因子により初期化することができ、STO 細胞よりも MEFs 細胞の方が、HDDPCs 由来 iPS 細胞の樹立・維持には良いことが示唆され、feeder 細胞の選択は、効果的な iPS 細胞の樹立に重要な要素であることが示唆された。

## 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) Issei Saitoh, Masahiro Sato, Yoko Iwase, Emi Inada, Toshiki Nomura, Eri Akasaka, Youichi Yamasaki, Hirofumi Noguchi: Generation of mouse STO feeder cell lines that confer resistance to several types of selective drugs. Cell Medicine, 3(1); 97-102, 2012.  
DOI:<http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639414>

〔学会発表〕 (計 1 件)

(1) 村上智哉, 齊藤一誠, 稲田絵美, 岩瀬陽子, 長谷川大子, 窪田直子, 松本祐子, 大島邦子, 岡暁子, 山崎要一, 早崎治明: Choice of feeders is important for the preparation of iPS cells from primarily cultured human deciduous tooth dental pulp cells, 第 51 回日本小児歯科学会大会, 岐阜市, 2013. 5. 23-24.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○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  
新潟大学 小児歯科学分野  
<http://www.pediatric-dent.net/pedo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 陽子 (SAITO YOKO)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30404487

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：