

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592867

研究課題名(和文) ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた全能性・胚性幹細胞の誘導に関する研究

研究課題名(英文) Study on induction of the totipotent embryo-stem cells from human bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

伊澤 俊次 (Izawa, Shunji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20273998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞は潜在的全能性を保持し炎症性サイトカインの刺激により、組織特異的な全能性を賦活するという研究成果をもとに、歯の再生を目標として、骨髄間葉系幹細胞を用いた全能性/胚性幹細胞の誘導実験を計画した。その結果、TNF とアクチビンAの組み合わせ因子が骨髄間葉系幹細胞だけでなく脂肪由来幹細胞の初期化に有用であることが示唆された。この事実はTNF とアクチビンAの組み合わせ因子が骨髄間葉系幹細胞や脂肪由来幹細胞などの組織幹細胞を初期化してES細胞を誘導し歯の再生のみならず全身の組織の再生が可能になりその意義は絶大である。

研究成果の概要(英文)：Based on our past results that bone marrow mesenchymal stem cells keep potential totipotency and activate tissue-specific totipotency by stimulation of inflammatory cytokine, we planned the induction experiment of the totipotent / embryo-stem cells from bone marrow mesenchymal stem cells. And as the results, it was suggested that the combination of TNF and activin A factor is useful for the initialization of not only bone marrow mesenchymal stem cells but also adipose derived stem cells. as for this fact, not only the regeneration of the tooth but also the whole body is enabled, and the significance is profound.

研究分野：歯科保存修復学

キーワード：骨髄間葉系幹細胞 脂肪由来幹細胞 免疫賦活因子 環境因子 細胞の初期化 ES細胞 組織再生

1. 研究開始当初の背景

う蝕などによって失われた歯質(象牙質・エナメル質など)の形態,機能の回復には金属,プラスチック,セラミックスなどの人工物では限界があり,生物学的再生療法が理想的な治療法と考えられる.すなわち生体の持つ自然治癒力によって歯質を再生させることが最良の治療法になる.

我々はこれまでに,骨髄間葉系幹細胞は象牙芽細胞にも分化し,象牙質の再生が可能であると考へ,2004年にヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙芽細胞分化実験を開始し,2006年の国際歯科学会(IADR)(プリズベン)でその成果を発表した.さらに象牙質再生について2008年にIADR(トロント),2009年日本再生歯科医学会(日本,北九州市)で発表し,論文発表(日本再生歯科医学会誌「ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙芽細胞分化と象牙質再生」2009年)も行った.さらに2010年にはヒト骨髄間葉系幹細胞は分化しても潜在的全能性が保たれることを発表し(日本再生歯科医学会,名古屋市),2011年には,代表的炎症性サイトカインであるTNFをヒト骨髄間葉系幹細胞に用いて,その組織特異的の全能賦活能について発表した(日本再生歯科医学会,大阪市).

世界では,既に京都大学の山中伸弥教授らのグループが,皮膚の線維芽細胞を用いて人工的に遺伝子導入した人工の万能細胞(iPS細胞)の作製に成功しており,歯科でも実際にiPS細胞を用いた組織再生実験は実際に行われている(歯周組織再生におけるiPS細胞の応用 J Cell Physiol. 2010 Jul 23. Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. Duan X, Tu Q, Zhang J, Ye J, Sommer C, Mostoslavsky G, David K, Yang P, Chen J.).しかし,iPS細胞は,皮膚細胞に3から4種類の遺伝子を導入して作る人工誘導細胞であり,がん化や

短命などばらつきが多いことが報告されている.そこで我々は,cellular shuttlingの概念に基づき,生体が本来備えている自然治癒力,自然再生力を賦活する因子を検索し,その賦活因子を用いて骨髄間葉系幹細胞から全能性/胚性幹細胞を誘導し,象牙質・エナメル質複合体の再生のみならず,歯の再生まで視野に本実験研究を計画した.

2. 研究の目的

これまでのヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙質・エナメル質複合体の再生実験の研究成果および実験計画遂行の過程から,ヒト骨髄間葉系幹細胞は潜在的全能性を保持し,分化してもその全能性が保たれること.そして炎症性サイトカインの刺激により,組織特異的の全能性が賦活されることを発表した(2010年,11月,日本再生歯科医学会学術大会,名古屋).そこで本研究では,これらの成果をもとに,生体が本来持っている免疫能力,再生能力を最大限に賦活させ,齲蝕などで失われた象牙質,エナメル質の再生のみならず,歯の再生を目標として,ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた全能性/胚性幹細胞の誘導実験を計画した.

3. 研究の方法

平成24年度は,研究目的である免疫賦活因子の検索とその機能の解析および初期化因子の検索探求に基づき,免疫反応の初発システムである炎症反応誘導に關与する炎症性サイトカイン(IL-1,IL-6,TNF-など)をヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSCs)に用いてコントロールとの機能比較解析を行い,細胞のエピジェネティックプロファイルの初期化,すなわちES細胞の細胞分化制御領域(bivalent domain)の初期化因子を検索探求を行った.材料と方法は,第5継代hMSCを実験に用いた.代表的免疫開始因子としてIL-1,IL-6,TNFを,培地としてDMEM+10%FBS+1%ペニシリンストレプトマイシンを用い,Dishにて培養し,開始因

子を加えないコントロール群と比較して, 1 W, 2 W, 3 W経過時のマーカー遺伝子発現の比較分析をリアルタイムPCR法を用いて行った. 遺伝子発現の定量分析にはThermal Cycler Dice Real Time System(TaKaRa)を用いて行った. 平成 25年度は, 胚性幹細胞発生の環境と平成 24年度で選別した免疫賦活候補因子(初期化因子)についてさらに詳細な解析, 検討を行い, 有力な初期化候補因子を絞り込み, これをヒト骨髄間葉系幹細胞に用いて, 胚性幹細胞発生環境下で初期化因子発現を抑制している転写因子をコントロールしつつ, cellular shuttlingの概念に基づき自然治癒力あるいは再生力賦活による胚性幹細胞の誘導を行った. 材料と方法は, ヒト骨髄間葉系幹細胞(RIKEN BioResource Center)を用い滅菌シャーレ上に播種調整し, CO2インキュベーターAC1-165Dで培養した. 培地には, 血清不含の霊長類ES/iPS細胞様培地(ReproCELL)あるいはSTK2を用いた. 播種後, 各初期化候補因子を至適濃度で培地に加え, 経時的な形態変化を生物顕微鏡(オリンパスCX41)で観察した. さらに, リアルタイムPCR法を用い発現遺伝子およびマーカーの発現変化を比較解析した. 具体的には, 群間発現比較分析を行い, 炎症性サイトカイン投与と非投与の比較を行った. 平成 26年度は, 昨年度の結果を踏まえ, ヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)のプロファイル初期化について調べた. 材料と方法は, 第5継代 hASCs を実験に用いた. 培地として STK2+1%ペニシリンストレプトマイシンを用い, 免疫開始因子としてTNFを, 環境因子としてアクチビンAを用い, Dishにて培養し(1群, 試験群), 因子を加えない2群(対照1群), TNFのみを加えた3群(対照2群), アクチビンAのみを加えた4群(対照3群)間で, 初期化の指標となる遺伝子OCT-4の経時的発現についてリアルタイムPCR法を用いて調べた.

4. 研究成果

平成 24年度は, ES細胞の初期化因子の探索を行い, TNFなどがES細胞の初期化に有用であることが示唆された. その結果, 試験全能性賦活因子群ではコントロール群と比較して, 全能性マーカー遺伝子が高度に発現し, hMSCsのプロファイル初期化に有用であることが示唆された.

この結果・結論より, ES細胞の初期化が可能になれば, cellular shuttlingの概念に基づき, 生体が本来備えている自然治癒力, 自然再生力の賦活因子により, 骨髄間葉系幹細胞を全能性/胚性幹細胞に誘導し, 象牙質・エナメル質複合体の再生のみならず, 歯の再生までも可能になる.

平成 25年度はこの実績に従い, 免疫賦活因子および全能性賦活因子としてTNFに着目し, さらに発生環境因子としてアクチビンAを用いて細胞初期化実験を行った. その結果, 初期化の指標となる遺伝子OCT-4等が高度に発現し, TNFとアクチビンAの組み合わせ因子がhMSCsのプロファイル初期化に有用であることが示唆された. そして最終年度平成 26年度はhMSCsだけでなくヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)のプロファイル初期化について調べた. その結果試験群では対照1, 2, 3群と比較して初期化の指標となる遺伝子OCT-4が高度に発現し, TNFとアクチビンAの組み合わせ因子がhASCsにおいてもプロファイル初期化に有用であることが示唆された. これらの結果は, TNFとアクチビンAの組み合わせ因子が全ての組織に存在する組織幹細胞を初期化して全能性細胞(ES細胞)の誘導することを示唆している. これによりTNFとアクチビンAの組み合わせ因子がhMSCsやhASCsなどの組織幹細胞を初期化してES細胞を誘導し歯の再生のみならず全身の組織の再生が可能になりその意義は絶大である.

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2件)

Shunji IZAWA, Kozo YAMAJI, Tomohiro
HOSHIKA, Yoshihiro NISHITANI and
Masahiro YOSHIYAMA

Induction of ES cell by the Human Bone
Marrow Mesenchymal Stem Cells
-Epigenetic Control and Initialization of
the Cells-

Journal of Oral Tissue Engineering

査読有, vol 3, 2014, pp 220-226

Shunji IZAWA, Kozo YAMAJI, Tomohiro
HOSHIKA, Yoshihiro NISHITANI and
Masahiro YOSHIYAMA

Study of Pluripotency and Activation of
Totipotency in Human Bone Marrow
Mesenchymal Stem Cells

Journal of Oral Tissue Engineering

査読有, vol 2, 2012, pp 95-103

〔学会発表〕(計3件)

伊澤 俊次, 山路 公造, 星加 知宏,
西谷 佳浩, 吉山 昌宏

ヒト脂肪由来幹細胞を用いたES細胞の誘導
に関する研究-エピジェネティック制御と細
胞の初期化-

第12回日本再生歯科医学会学術大会・総会

徳島大学 藤井節郎記念科学センター(徳
島県徳島市) 2014年8月26日

伊澤 俊次, 山路 公造, 星加 知宏,
西谷 佳浩, 吉山 昌宏

ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いたES細胞の
誘導に関する研究-エピジェネティック制御
と細胞の初期化- 第11回日本再生歯科医
学会学術大会 2013年8月31日 日本
大学理工学部 CST ホール(東京都千代田区)

伊澤 俊次, 山路 公造, 星加 知宏,
西谷 佳浩, 吉山 昌宏

骨髄間葉系幹細胞を用いたES細胞の誘導
に関する研究-免疫賦活因子および初期化因
子の探索- 第10回日本再生歯科医学会学
術大会 2012年9月1~2日 ニチイ学
館神戸ポートアイランドセンター(兵庫県
神戸市)

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊澤 俊次 (IZAWA, Shunji)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 20273998

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

吉山 昌宏 (YOSHIYAMA, Masahiro)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号： 10201071