

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792197

研究課題名(和文) ヒト i P S 細胞の誘導効率を高める新規初期化因子の発見

研究課題名(英文) Identification of a new factor to promote human iPS cell generation

研究代表者

玉置 也剛 (Tamaoki, Naritaka)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40585303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、種々の形成段階にある抜去智歯より歯髄細胞(DPCs)を多数樹立し、その初期化能について解析・検討を行ってきた。その結果DPCsの初期化能は由来するドナー歯の形成段階に大きく依存し、歯根未完成期DPCsは歯根完成期DPCsに比べて、著明に初期化能が高いことが分かった。DNAマイクロアレイを用いて、両群の遺伝子発現量について網羅的に解析したところ、歯根未完成期DPCsは歯根完成期に比べ、DLX4の発現レベルが著明に高く、実際にDLX4を誘導因子として用いると、歯根完成期DPCsだけでなく、ヒト皮膚線維芽細胞の初期化を促進する効果があることを発見した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that the reprogramming potential of human dental pulp cells (DPCs) obtained from immature teeth is much higher than those of mature teeth DPCs. Furthermore, immature teeth DPCs can be reprogrammed by OCT3/4 and SOX2, conversely these two factors are insufficient to convert mature teeth DPCs to pluripotent states. Using a gene expression profiles between these two DPC groups, we identified a new transcript factor, distal-less homeobox 4 (DLX4), which was highly expressed in immature teeth DPCs and significantly promoted human iPSC generation in combination with OCT3/4, SOX2, and KLF4. We further show that activation of TGF- β signaling suppresses the expression of DLX4 in DPCs and impairs the iPSC generation of DPCs. Our findings indicate that DLX4 can functionally replace c-MYC and supports efficient reprogramming of immature teeth DPCs.

研究分野：ヒト体細胞の初期化

キーワード：歯髄細胞 iPS細胞 誘導効率 DLX4

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの研究で、歯髄細胞 (DPCs) はヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) と比べて高い効率と短い期間で iPS 細胞の誘導が可能で、iPS 細胞化に非常に適した有望なリソース細胞であることを見出した。ところが DPC 株を由来するドナー歯の形成段階別に (歯冠完成期; Crown Completed, CC、歯根形成期; Root Forming, RF、歯根完成期; Root Completed, RC) 誘導効率を比較すると、RC 期の DPCs 株は他の形成期の DPCs に比べ顕著に誘導効率が低いことが分かった。体細胞の初期化では、体細胞の遺伝子発現レベルやエピジェネティック状態に大きく影響されることが知られている。このため我々は RC 期 DPCs に比べ、CC 期や RF 期の DPCs に特異的に高発現している遺伝子の中に、ヒト iPS 細胞の誘導効率に深く関与する遺伝子が特定できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞の技術を臨床応用する際に、誘導効率の低さは大きな障害の一つである。我々は CC 期や RF 期 (歯根未完成期) の DPCs が RC 期 (歯根完成期) に比べて非常に iPS 細胞への誘導効率が高いことを見出した。さらに歯根未完成期の DPCs では、癌遺伝子である KLF4 と c-MYC を用いずに OCT3/4 と SOX2 (OS) の 2 因子のみでも iPS 細胞の誘導が可能であるのに対し、歯根完成期の DPCs では 2 因子で誘導できなかった。このことから歯根未完成期の DPCs では、ヒト iPS 細胞への誘導に深く関わる KEY 遺伝子 (または遺伝子群) が高く発現している可能性がある。本研究では、DNA マイクロアレイで網羅的に 2 つの細胞群の遺伝子発現レベルの差異について検討し、ヒト iPS 細胞の誘導に深く関与する遺伝子 (遺伝子群) を探る。また発見した遺伝子は KLF4 や c-MYC の代わりと成り得るかどうかについても検討する。この成果は iPS 細胞が抱える問題点である、低誘導効率と安全性の両方を同時に改善できるだけでなく、iPS 細胞への誘導のメカニズムの解明につながると期待できる。

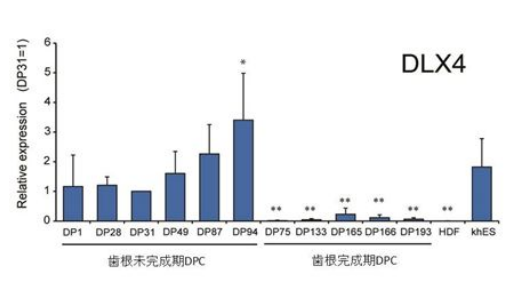
3. 研究の方法

DNA マイクロアレイを用いて歯根未完成期 DPC 群と歯根完成期 DPC 群の遺伝子発現量を網羅的に比較し、歯根未完成期 DPC 群に特異的に高発現している遺伝子をスクリーニングし、5 倍以上発現が高い遺伝子をピックアップした。この中で体細胞の初期化に関連のありそうな遺伝子をさらにピックアップし、pMX ベースのレトロウィルスベクターに組み込み、誘導効率の低い歯根完成期 DPCs の誘導効率を促進できる遺伝子を特定する。

4. 研究成果

(1) 歯根未完成期 DPCs では DLX4 の発現が高い。

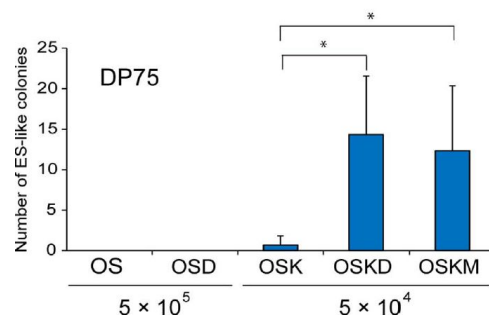
歯根未完成期 DPC 群で 5 倍以上発現量が高い遺伝子を 28 個ピックアップできた。この中でホメオボックス遺伝子である DLX4 は、約 35 倍発現が高く、転写因子の中で最も差があった。更に先行論文で、DLX4 が TGF-βシグナルをブロックすることが報告されているため、我々はまず DLX4 が体細胞の初期化に関与するかどうか検討した。Real-time PCR 解析にて、歯根未完成期の DPC 株では歯根完成期の DPC 株や皮膚線維芽細胞 (HDFs) に比べ、著明に発現量が高いことを確認した。更に歯根未完成期 DPCs の DLX4 の発現量は、ヒト ES 細胞と同程度であることも分かった (Fig1)。

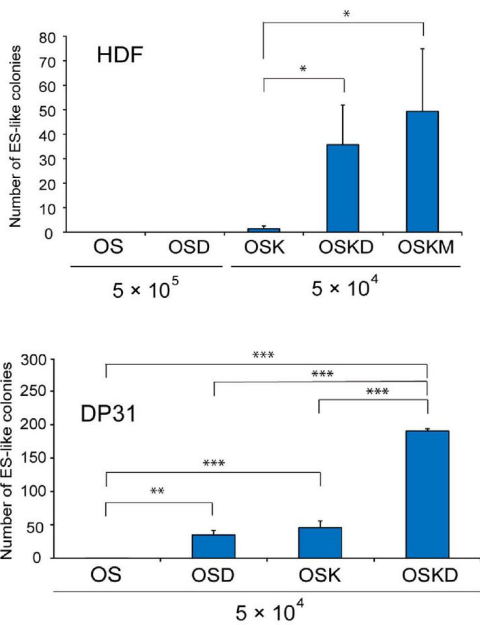


(Fig1) Real-time PCR 解析にて、歯根未完成期 DPCs は歯根完成期 DPCs や皮膚線維芽細胞 (HDFs) に比べ、DLX4 の発現量が非常に高いことが分かる。

(2) DLX4 はヒト体細胞の初期化を促進する。

歯根完成期 DPCs は OS の 2 因子では iPS 細胞の誘導ができなかったため、OS+DLX4 (OSD) の 3 因子で誘導できるかどうか検討したところ、残念ながら OSD でも iPS 細胞の誘導はできなかった。しかし OSD に KLF4 を加えた 4 因子 (OSKD) では従来の 3 因子 (OSK) に比べて著明に誘導効率が促進され、c-MYC を用いた 4 因子 (OSKM) と同程度の誘導効率を得られた (Fig2、上段)。同様に歯根未完成期 DPCs に比べて著明に誘導効率が低い HDFs に対しても、DLX4 は歯根完成期 DPCs と同じ効果が示された (Fig2、中段)。一方歯根未完成期 DPCs に対しても、DLX4 はヒト iPS 細胞の誘導効率を促進することが分かった。驚くことに、OS の 2 因子で誘導した場合に比べて、DLX4 を加えた OSD では著明に誘導効率が促進し、KLF4 を用いた 3 因子と同程度まで誘導効率が回復した (Fig2)。

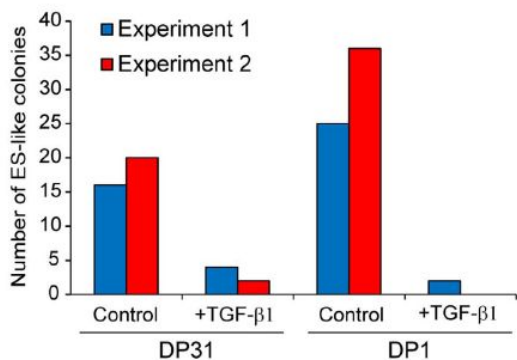




(Fig2) DP75 は歯根完成期 DPCs、DP31 は根末完成期 DPCs。Error bars indicate \pm S.D. (n=3). Asterisks indicate statistical significance; *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001. ES 細胞コロニーは感染後 30 日後にカウント。

(3) TGF- β シグナルは DPCs の内因性の DLX4 の発現量を抑制し、初期化を阻害する。

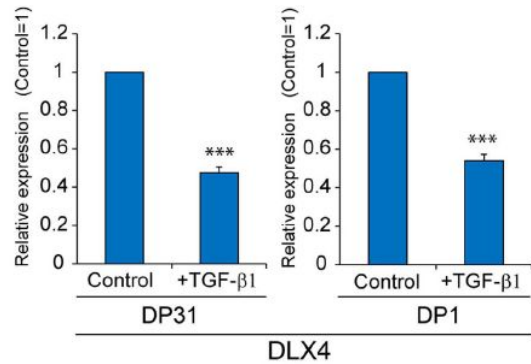
Fig2 に示すように DLX4 はヒト体細胞の初期化を促進することが分かった。次に我々は DLX4 がどのようにして、ヒト体細胞の初期化を促進するかについて、メカニズムの解析を試みた。TGF- β シグナルの阻害剤はマウスやヒト体細胞の初期化を促進することはいくつかの研究チームが報告している。実際に DPCs の初期化過程の際に、TGF- β シグナルの阻害剤を加え続けることで、iPS 細胞コロニーの数は著明に減少することが確認できた (Fig3)



(Fig3) 歯根未完成期 DPCs (DP1、DP31) でも、初期化の過程で TGF- β シグナルを加えると、誘導効率が著明に低下する。

また肺がん細胞株を用いた実験では、DLX4 が TGF- β シグナルをブロックすることで、c-MYC を促進させたり、EMT を阻害したりすることが報告されている (Oncogene. 2011

Jun 16;30(24)。しかし DPCs では DLX4 を強制発現させても、内因性の c-MYC の発現量は変化なかった。また DLX4 の強制発現では増殖能に変化も認められなかった。一方で TGF- β シグナルを加えると、DPCs の内因性の DLX4 の発現量は低下することが分かった (Fig4)



(Fig4) TGF- β シグナルは DPCs の DLX4 の発現を抑制する。

本研究では DLX4 がどのようにヒト体細胞の初期化を促進するかについて、そのメカニズムは、はっきり解明することはできなかった。しかし、ヒト iPS 細胞が抱える問題の一つである、誘導効率が低い点に対し、DLX4 を用いることで改善できることが分かった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Tamaoki N, Takahashi K, Aoki H, Iida K, Kawaguchi T, Hatakeyama D, Inden M, Chosa N, Ishisaki A, Kunisada T, Shibata T, Goshima N, Yamanaka S, Tezuka K *The homeobox gene DLX4 promotes generation of human induced pluripotent stem cells*. Sci Rep. 2014 Dec 4;4:7283. doi: 10.1038/srep07283. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

Naritaka Tamaoki, The homeobox gene DLX4 promotes generation of human induced pluripotent stem cells.

ASBMR2014 (アメリカ骨代謝学会総会)
(Plenary Poster Session, 2014/9/12-15, Houston, TX, USA)

玉置 也剛, ホメオボックス遺伝子 DLX4 はヒト iPS 細胞の誘導効率を促進する。
第 13 回 日本再生医療学会総会 (口演)
(2014/3/3-6、国立京都国際会館、京都市)

玉置 也剛, 歯髓細胞間における iPS 細胞への誘導効率の比較検討。
第 58 回 日本口腔外科学会総会 口演
(2013/10/11-13、福岡国際会議場、福岡市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

玉置 也剛 (TAMAOKI, Naritaka)

岐阜大学医学系研究科・助教

研究者番号：40585303