

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293418

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来ヒトiPS細胞からの歯形成細胞への分化誘導制御

研究課題名(英文) The tooth-format cellular differentiating regulation from iPSCs

研究代表者

齊藤 一誠 (Issei, Saitoh)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90404540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：LEF1は、48-kDの核タンパク質で、前B細胞および前T細胞での発現が報告されている。このLEF1は、生物の発生に重要なWnt/ $\beta$ -cateninシグナルにおける転写因子であり、 $\beta$ -cateninを介してWnt標的遺伝子の転写に関わると報告されている。

本研究では、遺伝子工学的手法にてLEF-1プロモーターを用い乳歯由来細胞およびiPS細胞からLEF1陽性細胞を単離し、当該細胞の幹細胞特性について検討することを目的とした。LEF1陽性単離細胞は、OCT3/4などの幹細胞マーカーの発現を示し、骨芽細胞と神経細胞への多分化能を有していた。

研究成果の概要(英文)：Lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) is a 48-kD nuclear protein that is expressed in pre-B and T cells. LEF1 is also an important member of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway that plays important roles in the self-renewal and differentiation of embryonic stem cells. We speculated that LEF1 might function in the stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). In this study, we attempted to isolate such LEF1-positive cells and iPS cells from human deciduous dental pulp cells (HDDPCs) by genetic engineering technology, using the human LEF1 promoter. RT-PCR analysis confirmed the expression of several stem cell markers, including OCT3/4, SOX2, REX1, and NANOG, in LEF1-positive HDDPCs, which could be differentiated into osteoblasts and neuronal cells.

研究分野：小児歯科学

キーワード：再生歯学 iPS細胞 歯髄幹細胞 乳歯

## 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く、歯科領域でも智歯や乳歯に由来する幹細胞の性質を有する細胞群が徐々に単離され、これらいわゆる体性幹細胞・前駆細胞を用いた歯の再生の可能性が論じられている。乳歯は小児期の歯の生え替わりで脱落し、廃棄されるのが常であったが、それを歯髄の供給源(バイオマス)として再利用出来るのではないかと(バイオリサイクル) また、teeth bank へのリソースとして利用出来るのではないかと、という見方が広まり、歯科に対する熱い関心が寄せられている。

平成 24 年度第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会サテライトシンポジウム「口腔領域における iPS 研究の現状と展望」において、歯科からの iPS 研究をさらに拡充していくことが示された。また、乳歯の歯髄がバイオマスとして非常に有効であることが再認識され、乳歯を用いた iPS 細胞研究の発展が大いに期待されている。我々の研究グループは、同シンポジウムにおいて、脱落乳歯の歯髄細胞(dental pulp cells, DPCs)からヒト iPS 細胞株樹立に成功したことを報告した。その過程で、DPCs の特性と iPS 細胞の樹立効率には相関性があることが明らかになった。

iPS 細胞は、繊維芽細胞等の分化細胞に 4 つの reprogramming factor 遺伝子を導入して得られ、ES 細胞と同等のポテンシャルを持つ細胞である。iPS 細胞は *in vitro* で無限に増え、かつ様々な分化細胞を生む。興味深い特徴としてヒト iPS 細胞は、分化誘導を行うと供給元の細胞の特性を持つ分化細胞への分化が報告されている。これは、ヒト体細胞の iPS 化の場合、初期化が完全でないことを意味し、歯組織由来 iPS 細胞の場合、分化誘導を行えば、歯を形成する細胞へ優先的に分化する可能性が高いことを意味する。一方、歯髄幹細胞(dental pulp stem cells, DPSCs)は免疫を回避したり、ナーシング機能(周りの細胞に対して保護採用を示す看護的な機能)などの特徴を有しており、歯のみならず、歯周組織、神経の再生医療へのカギとなる細胞である。しかし DPCs から得られる DPSCs は細胞数が限られ、有用な細胞であっても臨床応用には直接結び付けることができない。そこで、

無限増殖能を持つ iPS 細胞を介して、歯形成細胞を得ることができれば、より再生医療に直結すると考え、本研究の着想に至った。

また、LEF1 は、48-kD の核タンパク質であり、前 B 細胞および前 T 細胞での発現が報告されている。この LEF1 は、生物の発生に重要な Wnt/  $\beta$ -catenin シグナルにおける転写因子であり、 $\beta$ -catenin を介して Wnt 標的遺伝子の転写に関わることが報告されている。また、未分化な胚性幹細胞(ES 細胞)における未分化の維持・増殖に関与することも報告されている。さらに、*Lef1* 遺伝子の欠損したマウスによる研究より、歯の発生において LEF1 は重要な役割を担っていることが示唆されている。LEF1 は ES 細胞の未分化の維持・増殖および歯の発生の初期の段階に関わることから、LEF1 が歯髄幹細胞を含めた未分化な歯系細胞のマーカーとなるのではとの考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、乳歯由来 iPS 細胞を用い、歯形成細胞までの分化誘導レベルの制御を目的としている。具体的には、遺伝子工学的手法を用いて、乳歯由来 iPS 細胞を分化誘導し、LEF1 陽性細胞を単離し、単離した細胞が幹細胞としての性質を有しているのかを検討する。

## 3. 研究の方法

歯構成細胞や歯髄幹細胞に特異的に稼働するプロモーターを用い、分化誘導レベルを制御するために、PiggyBac 系を用いてすでに樹立している乳歯由来 iPS 細胞から組織幹細胞を選別・濃縮するためのプラスミドを構築した。

乳歯 DPCs 由来のヒト iPS 細胞に、PiggyBac 系のプラスミドを導入し、組換え iPS 細胞株を樹立する。これらの細胞を用い、*in vitro*、*in vivo* での分化誘導を行い、歯構成細胞、DPSCs を選別する。得られた細胞が DPSCs としての機能を示すかを検証するため、分子生物学的、生化学的、組織学的解析を行った。

## 4. 研究成果

本研究では、LEF-1 プロモーターを配し

たプラスミドベクターとして、遺伝子導入効率が高いとされる piggyBac トランスポゾン系を用いた。ヒト LEF-1 プロモーター + EGFP cDNA + 抗生物質耐性遺伝子 ( Neomycin ) を挿入したプラスミド pTA-LEN を作製した ( 図 1 )。

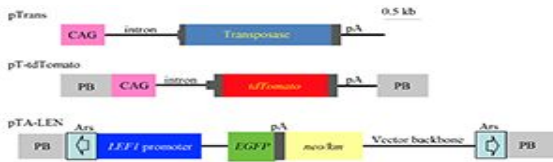


図 1 : piggyBac トランスポゾン系ベクター

新規構築プラスミドベクターである pTA-LEN を乳歯歯髄細胞 ( DPSCs ) へ遺伝子導入を行い、薬剤選択および EGFP 発現を指標とし、LEF-1 発現細胞を取得した ( 図 2 )。

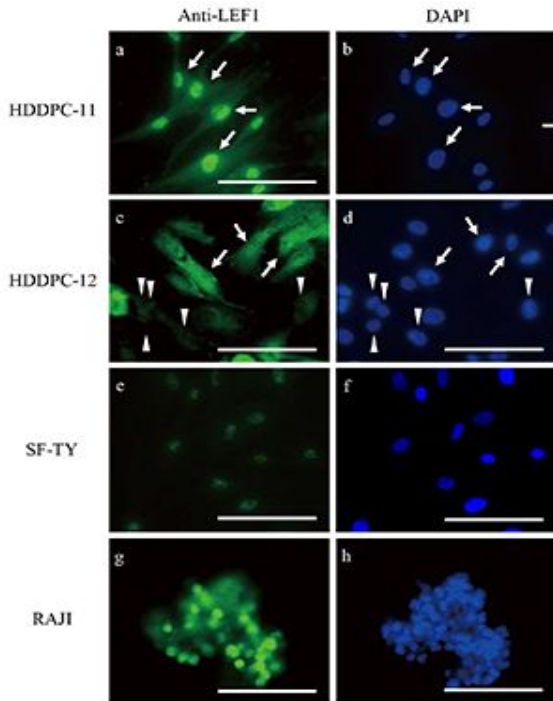


図 2 : 薬剤選択後の LEF-1 陽性細胞

さらに得られた LEF-1 発現細胞を骨系細胞へ分化誘導を行ったところ、アリザリンレッド染色陽性となり骨分化能を有している可能性が示唆された。加えて、LEF-1 発現細胞を神経系へ分化誘導を行った。分化誘導後の細胞は、Nissl 染色にて陽性を示し、神経系への分化能を有することが示唆された ( 図 3 )。

本研究で得られた LEF-1 陽性細胞は、乳歯歯髄幹細胞である SHED と同様の遺伝子遺伝子発現を有しており、遺伝子工学的な

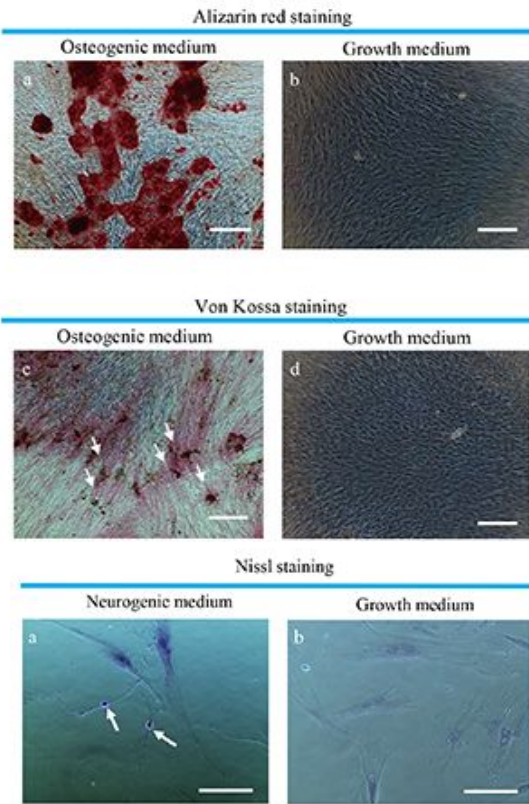


図 3 : 分化多能性

手法により乳歯歯髄幹細胞の取得が可能となった。

一方、乳歯 DPSCs 由来 iSP 細胞における piggyBac トランスポゾン系プラスミドの遺伝子導入における長期培養が可能であった ( 図 4 )。

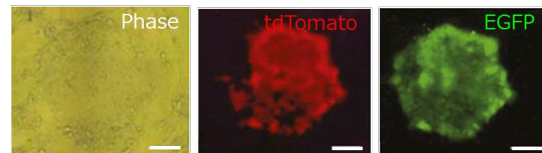


図 4 : 乳歯 DPSCs 由来 iPS 細胞への遺伝子導入株の樹立

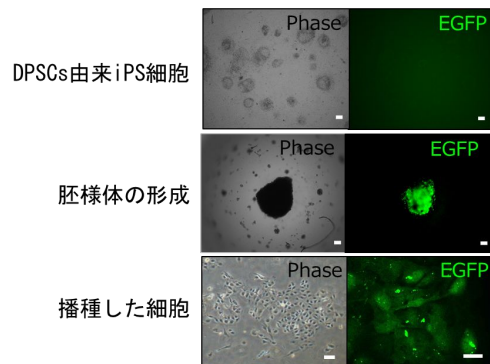


図 5 : 胚様体形成と播種細胞での LEF1 の発現

さらに、乳歯 DPSCs 由来 iPS 細胞へ pTA-LEN プラスミドを遺伝子導入し、胚様体形成後、その胚様体を再度播種した。iPS 細胞では、未分化の状態であるために、EGFP の発現は認められなかったが、胚様体を形成し分化が進行すると EGFP の発現を認め、さらにそれを播種し接着細胞として再度培養すると、EGFP の発現を認めた(図5)。また、RT-PCR により、OCT3/4、NANOG などの幹細胞マーカーの発現を認め、免疫染色により CD44、STRO-1 の発現をみとめた(図6)。

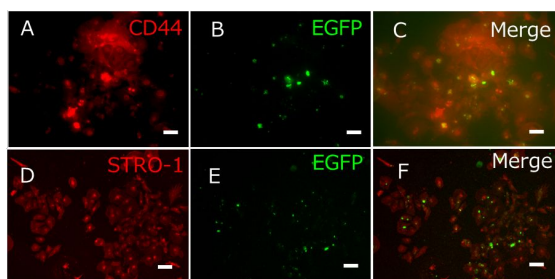


図6 : CD44 および STRO-1 の発現

以上より、遺伝子工学的手法を用い、乳歯 DPSCs 由来 iPS 細胞を樹立し、その樹立細胞を用い分化誘導し、LEF1 陽性細胞を単離することが可能となった。また、単離した細胞は歯髄幹細胞としての性質を有していることが明らかとなった。

本研究により得られた細胞を用いた基礎的な研究から、将来歯・神経・骨の再生へ向けた臨床応用が加速する可能性は高く、学術的な意義は非常に高いと確信する。

## 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7件)

Tomoya Murakami, Issei Saitoh, Masahiro Sato, Emi Inada, Miki Soda, Masataka Oda, Hisanori Domon, Yoko Iwase, Tadashi Sawami, Kazunari Matsueda, Yutaka Terao, Hayato Ohshima, Hirofumi Noguchi, Haruaki Hayasaki: Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1

promoter-driven selection markers. Archives of Oral Biology, 81(1-2); 110-120, 2017. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.033. (査読あり)

Masahiro Sato, Issei Saitoh, Emi Inada: Efficient CRISPR/Cas9-based gene correction in induced pluripotent stem cells established from fibroblasts of patients with sickle cell disease. Stem Cell Investigation. 3; 78, 2016. doi: 10.21037/sci.2016.11.05 (査読あり)

Masahiro Sato, Kosuke Maeda, Miyu Koriyama, Emi Inada, Issei Saitoh, Hiromi Miura, Masato Ohtsuka, Shingo Nakamura, Takayuki Sakurai, Satoshi Watanabe, Kazuchika Miyoshi. The piggyBac-Based Gene Delivery System Can Confer Successful Production of Cloned Porcine Blastocysts with Multigene Constructs. International Journal of Molecular Sciences. 2016 Aug 30;17(9). pii: E1424. doi: 10.3390/ijms17091424. (査読あり)

Issei Saitoh, Emi Inada, Yoko Iwase, Hirofumi Noguchi, Tomoya Murakami, Miki Soda, Naoko Kubota, Hiroko Hasegawa, Eri Akasaka, Yuko Matsumoto, Kyoko Oka, Youichi Yamasaki, Haruaki Hayasaki, Masahiro Sato. Choice of feeders is important for the preparation of iPS cells from primarily cultured human deciduous tooth dental pulp cells. Cell Medicine. 8(1-2); 9 - 23, 2015. DOI: 10.3727/215517915X689038. (査読あり)

Emi Inada, Issei Saitoh, Hiromi Miura, Masato Ohtsuka, Tomoya Murakami, Tadashi Sawami, Youichi Yamasaki, Satoshi Watanabe, Reiji Aoki, Masahiro Sato. PiggyBac transposon-mediated gene delivery efficiently generates stable transfectants derived from cultured primary human deciduous tooth dental pulp cells (HDDPCs) and HDDPC-derived

iPS cells. International Journal of Oral Science. 7(3); 144 - 154, 2015. DOI: 10.1038/ijos.2015.18. (査読あり)

Masahiro Sato, Akiko Kagoshima, Issei Saitoh, Emi Inada, Kazuchika Miyoshi, Masato Ohtsuka, Shingo Nakamura, Takayuki Sakurai and Satoshi Watanabe. Generation of -1,3-Galactosyltransferase-Deficient Porcine Embryonic Fibroblasts by CRISPR/Cas9-Mediated Knock-in of a Small Mutated Sequence and a Targeted Toxin-Based Selection System. Reproduction in Domestic Animals. 50(5): 872-880, 2015. (査読あり)

Masahiro Sato, Emi Inada, Issei Saitoh, Yuko Matsumoto, Masato Ohtsuka, Hiromi Miura, Shingo Nakamura, Takayuki Sakurai, Satoshi Watanabe: A combination of targeted toxin technology and the piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. Biotechnology Journal, 10(1); 143-153, 2015. (査読あり)

[学会発表](計8件)

稲田絵美, 齊藤一誠, 窪田直子, 村上智哉, 左右田美樹, 澤味規, 松枝一成, 早崎治明, 山崎要一: 遺伝子工学的手法による不死化ヒト乳歯歯髄細胞株の樹立と特性解析. 第55回日本小児歯科学会大会, 2017.5.25-26. 西日本総合展示場. 福岡県北九州市. (査読なし)

Tomoya Murakami, Issei Saitoh, Masahiro Sato, Emi Inada, Miki Soda, Yoko Iwase, Tadashi Sawami, Ayako Suzuki, Hayato Ohshima, Haruaki Hayasaki. The genetic engineering-based isolation of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) positive stem-like cells from human deciduous tooth cell-derived iPSCs. 45rd Annual Meeting & Exhibition of the AADR/ 40h Annual Meeting of the CADR, Los Angeles, CA, USA, 2016.3.16-19.

(査読あり)

Miki Soda, Issei Saitoh, Emi Inada, Tomoya Murakami, Ayako Suzuki, Tadashi Sawami, Akiko Kagoshima, Yoko Iwase, Yutaka Terao, Hayato Ohshima, Haruaki Hayasaki, Masahiro Sato. ALP as a reliable marker for predicting early reprogramming. 45rd Annual Meeting & Exhibition of the AADR/ 40h Annual Meeting of the CADR, Los Angeles, CA, USA, 2016.3.16-19.

(査読あり)

Tomoya Murakami, Issei Saitoh, Masahiro Sato, Emi Inada, Miki Soda, Yoko Iwase, Tadashi Sawami, Ayako Suzuki, Hayato Ohshima, Haruaki Hayasaki. The genetic engineering-based isolation of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) positive stem-like cells from human deciduous tooth cell-derived iPSCs. 10<sup>th</sup> Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia in conjunction with 54<sup>th</sup> Annual Conference of the Japanese Society of Pediatric Dentistry, Tokyo, Japan, 2016.5.26-27.

(査読あり)

稲田絵美, 佐藤正宏, 齊藤一誠, 窪田直子, 澤味規, 村上智哉, 左右田美樹, 早崎治明, 山崎要一: ヒト乳歯歯髄細胞のアルカリホスファターゼ活性とOCT-3/4発現はiPS細胞樹立の可否を予測する有効なマーカーである. 第53回日本小児歯科学会大会, 広島市・広島国際会議場, 2015.5.21-22.

(査読なし)

Miki Soda, Issei Saitoh, Emi Inada, Tomoya Murakami, Yoko Iwase, Naoko Kubota, Tadashi Sawami, Yuko Matsumoto, Youichi Yamasaki, Haruaki Hayasaki, Hayato Ohshima, Masahiro Sato. piggyBac-transposon-mediated gene-delivery efficiently generates stable transfectants from HDDPCs and HDDPC-derived-iPSCs. IADR/AADR/CADR 93rd General Session and Exhibition,



Boston, U.S.A., 2015.3.11-14.

( 査読あり )

稲田絵美, 齊藤一誠, 窪田直子, 松本裕子, 村上智哉, 澤味規, 山崎要一: *piggyBac* トランスポゾンによるヒト乳歯歯髓細胞からの遺伝子導入安定株の効率的取得, 第52回日本小児歯科学会大会, 東京都・きゅりあん, 2014.5.16-17. ( 査読なし )

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/pedo/pedo.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 一誠 (SAITOH, Issei)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号: 90404540

### (2) 研究分担者

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)  
鹿児島大学・医用ミニブタ先端医療開発センター・教授  
研究者番号: 30287099

稲田 絵美 (INADA, Emi)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号: 30448568

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)  
琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 50378733

山崎 要一 (YAMASAKI, Youichi)  
鹿児島大学・歯学部・教授  
研究者番号: 30200645

齊藤(岩瀬) 陽子 (IWASE, Yoko)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 30404487

大島 勇人 (OHSHIMA, Hayato)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 70251824

松山 清 (MATSUYAMA, Kiyoshi)  
久留米工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授  
研究者番号: 40299540