

平成22年 5月10日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890091
 研究課題名（和文）ヒト歯髄組織幹細胞の樹立効率向上とiPS細胞化の検討
 研究課題名（英文）The improvement of establishment efficiency and the induction to iPS cells of human dental pulp stem 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）：低酸素分圧下での培養により、ヒト歯髄組織幹細胞(DPSC)は高い増殖能を呈し、高齢者からの樹立効率が向上した。また、iPS細胞への誘導においては、従来の4因子、3因子を用いた方法でDPSCからiPS細胞を誘導できた。誘導効率は皮膚線維芽細胞に比べて大きく改善した。

研究成果の概要（英文）：hDPSCs grown under 3%O₂, showed significantly higher proliferation than those under 21% O₂. To improve low efficiency of isolating hDPSCs from old patients, we applied hypoxia culture and succeeded in isolation and expansion hDPSCs. We evaluated hDPSCs as an optimal source of iPS cells. hDPSCs tested with the conventional 3 or 4 reprogramming factors, iPS cells were effectively established. We observed significantly more iPS cell colonies with hDPSCs than with the control human dermal fibroblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,360,000	408,000	1,768,000
2009年度	1,180,000	354,000	1,534,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1) 歯学 (2)組織幹細胞 (3)歯髄

1. 研究開始当初の背景

再生医学は近年目覚しく発展しており、とりわけ既に形成されている組織中に存在し限定的な分化能と増殖能を持つ「組織幹細胞」の応用が期待され、活発な臨床研究が展開されている。口腔領域においても、2000

年頃より、歯髄に「組織幹細胞」である歯髄組織幹細胞(Dental Pulp Stem Cell: DPSC)が含まれていることが証明され有望な医療資源として多くの研究が展開されている。

我々も今後の再生医療への貢献を目的に、「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、医療廃棄物として処理されていた抜歯後の智歯より150ラインのヒト智歯由来幹細胞を樹立し、智歯の発生状態が未熟な形成期の智歯歯髄から得られる DPSC は、高い増殖能を持つが、継代するにつれ増殖能・分化能(ステムネス性)が低下すること、継代に伴う遺伝子の変化を DNA アレイで網羅的に検索した所、WNT シグナル(Wnt-16)やイノシトール三リン酸受容体(ITPR1)の発現が大きく変化することを明らかにし、幹細胞の老化(ステムネス性の喪失)にこれらの遺伝子が関与することを示して来た。

また、先行する骨髄由来幹細胞の研究に於いて、低酸素状態での培養がステムネス性維持に有効であることが示され、我々も、DPSC を低酸素(3%)・低密度で培養すると、コロニー形成能の増加や増殖能が上がることを明らかにしつつある。この結果は、採取した DPSC を良質に維持するのみならず、採取が困難である高齢者からの幹細胞採取にも応用可能と考えられ、ヒト DPSC を用いた今後の再生医療を展開する上で極めて重要なテーマになると考えられる。

さらに、近年、ヒトの皮膚細胞から ES 細胞とほぼ同等能力を有する多能性幹細胞(iPS)が樹立可能であることが示された。我々は、ヒト智歯由来 DPSC の高い増殖能に注目し、iPS 細胞の誘導を試み、iPS 細胞様コロニーを得、今後の詳細な性状解析および保有する多数のラインでの誘導効率・個体差を比較する材料を得て来ている。

2. 研究の目的

我々は、種々の形成段階にあるヒト智歯より DPSC を既に 150 ライン樹立・保有し、個体差の検証を行って来ている。その結果、より未熟な形成期の智歯歯髄から得られる 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を明らかにして来た。また、智歯由来 DPSC は、低酸素(3%)、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も明らかにしつつある。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高率に得、DPSC が iPS 細胞の源として活用可能であることが示されつつある。そこで、本研究では、我々が保有する豊富な 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と共に、低酸素・低密度培養による検討を進め採取が困難とされる高齢者からの DPSC の樹立効率の向上および iPS 細胞化を検証し、再生医療に活用可能な医療資源の開拓を目指す。

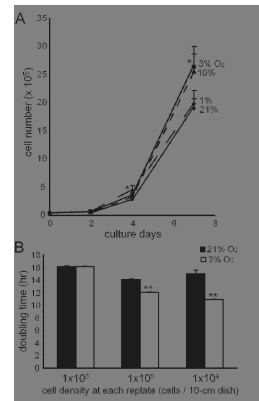
3. 研究の方法

ヒト DPSC を高齢者からも効率よく採取可能にするための方法を見出すために、保有する若年者のヒト智歯由来 DPSC を用い、「低酸素培養が DPSC の増殖・分化能に及ぼす影響」を検討し、「低酸素培養法を用いた高齢者からの DPSC 採取効率の向上」を目指す。また、保有するヒト智歯由来 DPSC (歯冠完成期・歯根完成期)を用い、iPS 細胞化を行い、誘導効率の差異(個体差)の検証を行う。

4. 研究成果

(1) 低酸素培養での hDPSC 増殖能の亢進

hDPSC を様々な酸素分圧下(1,3,10 と 21%)で培養したところ、3%酸素下での増殖能が最も高いことがわかった(A)。そこで 21%と 3%酸素下で比較したところ 3%では初代培養での細胞定着能が高く(B)、hDPSC が低酸素・低密度条件において増殖能を亢進することを認めた。

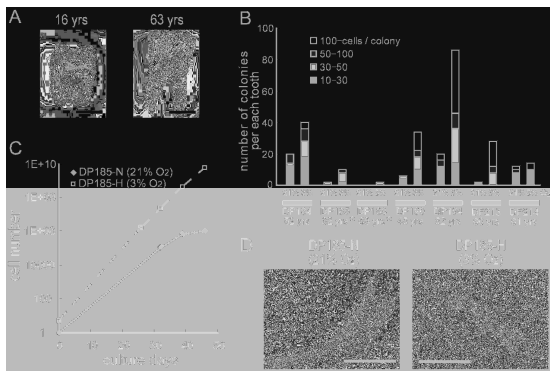


(2) 長期培養時の低酸素が増殖能や分化能に与える影響

低酸素培養が hDPSC に与える影響を評価するため、21%と 3%酸素下で継代培養を長期間行ったが、2つの培養条件間での細胞の増殖能および細胞形態、骨/象牙芽細胞への分化能に差は認めなかった。

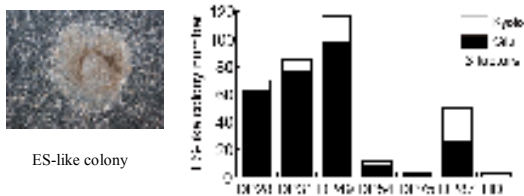
(3) 低酸素培養を用いた高齢者からの hDPSC 樹立

高齢者の hDPSC は、若年者に比べて組織が小さく細胞数が少ないため、樹立に多くの時間を要する(A,C)。そこで、低酸素培養にて樹立を試みたところ、初代培養では効率よく細胞を得ることができ、21%酸素下で採取できなかった感染歯からも樹立することができた(B,D)。また低酸素培養で樹立された hDPSC は骨/象牙芽細胞への分化能を有することを認めた。



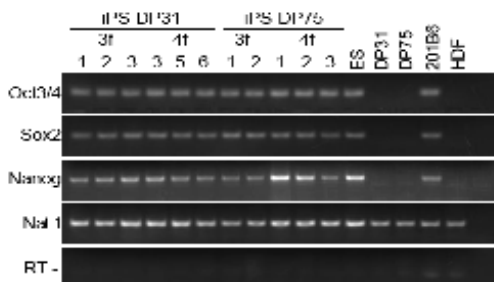
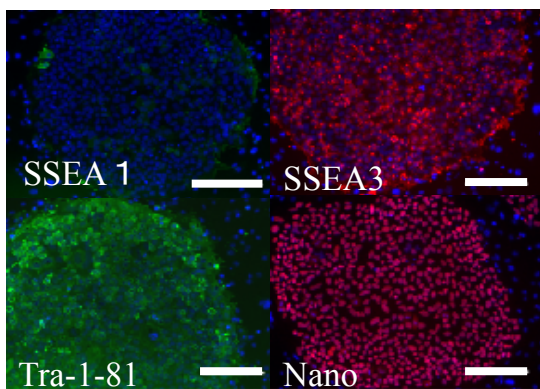
(4) hDPSC から iPS 細胞誘導

選択した 6 ラインの hDPSC すべて従来の 3 因子・4 因子を用いた方法で、iPS 細胞に誘導することができた。また誘導効率や期間は、DP75 を除いた 5 ラインでヒト皮膚線維芽細胞(HDF)に比べ大きく改善した。



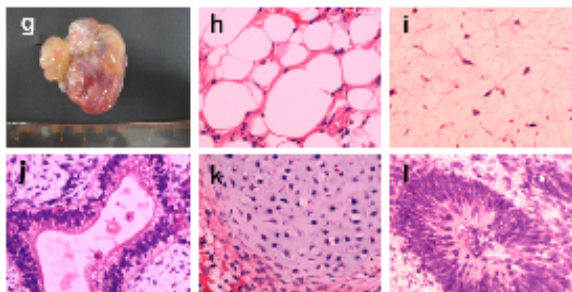
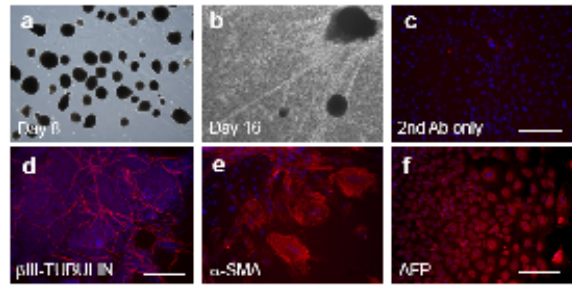
(5) hDPSC からの iPS 細胞での ES 細胞マーカーの発現

誘導した iPS 細胞は、ヒト ES 細胞に特異的な遺伝子の発現が認められた。



(6) hDPSC からの iPS 細胞での多分化能

多分化能を解析するため、EB を介した分化誘導をすると、3 胚葉系に細胞に分化することがわかった。次に hDPSC からの iPS 細胞を免疫不全マウスの精巣に移植すると、12 週後に 3 胚葉の組織を含む奇形腫ができた。これらの結果は、hDPSC からの iPS 細胞が ES 細胞と同等の多分化能を有すること示す。



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)

- ① N. Tamaoki, K. Takahashi, T. Tanaka, T. Ichisaka, T. Takeda-Kawaguchi, K. Iida, T. Kunisada, T. Shibata, S. Yamanaka, H. Aoki, K. Tezuka; Dental Pulp Cells as Source for iPS Cell Banks, *J Dent Res*, 2010, in press, 査読有
- ② T. Takeda, Y. Tezuka, M. Horiuchi, K. Hosono, K. Iida, D. Hatakeyama, S. Miyaki, T. Kunisada, T. Shibata, K. Tezuka; Characterization of Dental Pulp Stem Cells of Human Tooth Germs, *J Dent Res*, 2008, 87, 676-681, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 玉置也剛、飯田一規、川口知子、畠山大二郎、柴田敏之；ヒト歯髓幹細胞から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の誘導と iPS 細胞バンクの構築；第 54 回日本口腔外科学会総

会；2009年10月10日（札幌コンベンションセンター）

②飯田一規、川口知子、玉置也剛、畠山大二郎、柴田敏之；低酸素培養がヒト歯髄幹細胞の増殖および分化に与える影響；第54回日本口腔外科学会総会；2009年10月10日（札幌コンベンションセンター）

③玉置也剛、飯田一規、川口知子、畠山大二郎、柴田敏之；ヒト歯髄幹細胞からの人工多能性幹細胞（iPS細胞）の誘導；第63回日本口腔科学会総会；2009年4月16日（アクトシティ浜松）

④飯田一規、武田知子、手塚洋子、國定隆弘、柴田敏之、山中伸弥、手塚建一；低酸素分圧下での培養がヒト歯髄幹細胞の増殖および分化に与える影響；第8回日本再生医療学会総会；2009年3月5日（東京国際フォーラム）

⑤玉置也剛、高橋和利、田中孝之、武田知子、國定隆弘、柴田敏之、山中伸弥、手塚建一；ヒト歯胚幹細胞からの人工多能性幹細胞の誘導；第8回日本再生医療学会総会；2009年3月5日（東京国際フォーラム）

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：EFFICIENT METHOD FOR ESTABLISHING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

発明者：手塚 建一

権利者：手塚 建一 et al

種類：PCT/JP2008

番号：WO2010/013359

取得年月日：2010年2月4日

国内外の別：外国

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

なし

(3) 連携研究者

なし