

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：32710
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21659490
 研究課題名（和文）
 リポソームを用いた口腔粘膜細胞からの iPS 細胞作製技術の確立
 研究課題名（英文）
 Human iPS cells from oral mucosal tissues using the liposome non-viral gene delivery system
 研究代表者
 花田 信弘 (HANADA NOBUHIRO)
 鶴見大学・歯学部・教授
 研究者番号：70180916

研究成果の概要（和文）：

従来、iPS 細胞は、体細胞に 4 因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を、それぞれレトロウイルスやレンチウイルスなどのウイルスベクターで導入して樹立してきた。ウイルスベクターによる iPS 細胞の樹立は癌化の危険性を伴う。癌化の危険性を回避するためにリポソーム法など非ウイルス系ベクターによる細胞への遺伝子導入法が好ましい。そのことを明らかにするため、コントロールとしてウイルスベクター法ではあるが我が国で初めて歯根膜細胞から iPS 細胞を樹立した。レトロウイルスベクターを使用して作製した iPS 細胞は癌化のリスクを抱えていた。

研究成果の概要（英文）：

Traditional iPS cells establish methods used retrovirus transduction of the reprogramming 4 factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) which results in viral integration into the genome. The use of retroviruses is potentially problematic for clinical applications involving cells derived from iPS cells due to the significant increased risk of inducing a cancer transformation. A non-viral gene delivery system should be required to establish iPS cells, for example liposome method.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 2011 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 180,000 | 3,180,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：iPS 細胞、レトロウイルス、リポソーム、歯科医療安全

1. 研究開始当初の背景

(1) Induced pluripotent stem cell (iPS細胞)はES細胞のように分化多能性を持ち、ヒトES細胞が抱える倫理的問題や、免疫拒絶反応の課題をクリアできるので将来有望な細胞である。しかし、通常はレトロウイルスベクターによる遺伝子導入を行うため、がん化の危険性がある。レトロウイルスはエンベロープを持つ一本鎖RNAウイルスであり、感染した細胞内で逆転写されて二本鎖DNAとなった後に宿主ゲノムにランダムに組み込まれる。レトロウイルスであるマウスモロニー白血病ウイルス (MoMLV) 由来のウイルスベクターが古くから開発され利用されているが、MoMLVはアミノ酸トランスポーターを認識して感染しT細胞リンパ腫を引き起こす。レトロウイルスベクターの一種レンチウイルスベクターは、潜伏期間が長いという特徴を持つ。代表的なものとしてヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus) が知られている。

がん化のリスクを低減させるために今後はリポソームなど非ウイルスベクターを用いたiPS細胞作製技術の進展が望まれている。

(2) 細胞ソースには口腔粘膜細胞が最も採取しやすい。しかし抜去された歯から非侵襲的に容易に採取・単離でき、セメント芽細胞や骨芽細胞にも分化する能力を持つ歯根膜細胞も有望である。

2. 研究の目的

通法では、iPS細胞の樹立には、レトロウイルスによる遺伝子導入を行う。しかし、レトロウイルスは染色体に組み込まれるため、その安全性に疑問がある。そこで、レトロウイルスにより樹立したiPS細胞の安全性の検討を行い、更にリポソームなど非ウイルスベクターを用いたiPS細胞作製技術の必要性を

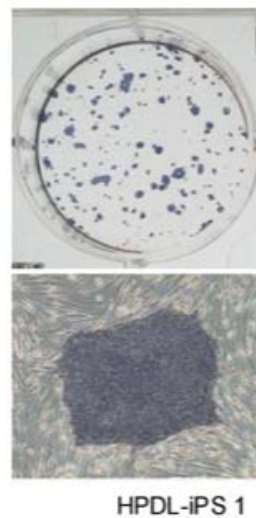
示す実験を企画した。

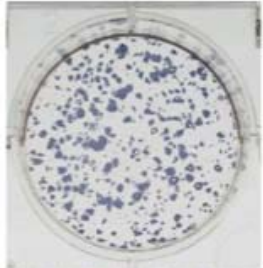
3. 研究の方法

リポソームを用いたiPS細胞作製の対照実験としてレトロウイルスによる遺伝子導入を実施し、新しいiPS細胞を樹立する。リポソームによる細胞への遺伝子導入法の検討は現在市販されている数種類のリポソームを用い、ウイルスベクター法をコントロールとしてヒト歯根膜細胞を用いて行った。

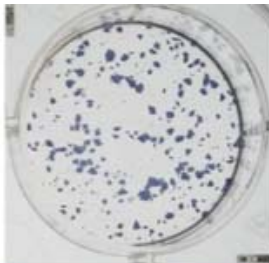
4. 研究成果

市販されている正常ヒト歯周靱帯線維芽細胞 (TaKaRa C7049) とレトロウイルスベクターを用いて5個のiPS細胞クローンを得た (図1)。

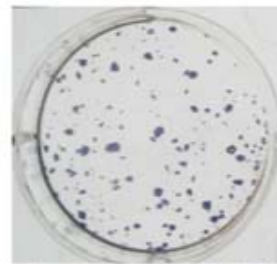
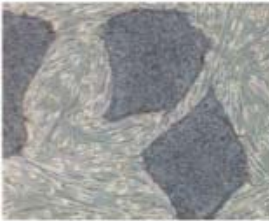




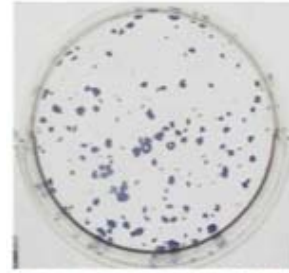
HPDL-iPS 2



HPDL-iPS 3



HPDL-iPS 4



HPDL-iPS 5



図1 本研究で歯根膜細胞から我が国で初めて樹立した5つのiPS細胞（アルカリフォスファターゼ染色）のクローン。以後の研究はHPDL-iPS2を用いて行った。

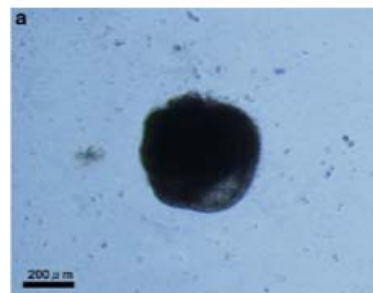


図2 HPDL-iPS2による胚様体形成。

10日間の培養でHPDL-iPS2による胚様体形成が確認された（図2）。

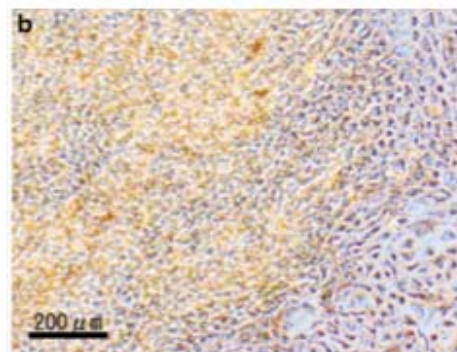


図3 HPDL-iPS2から分化した脂肪細胞

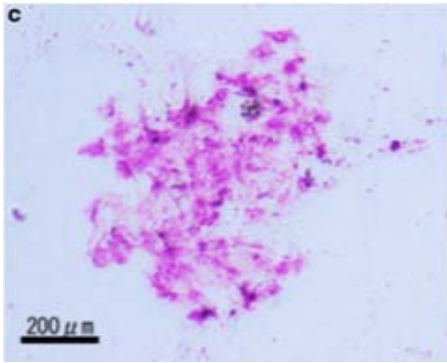


図 4-a HPDL-iPS2 から分化した骨組織

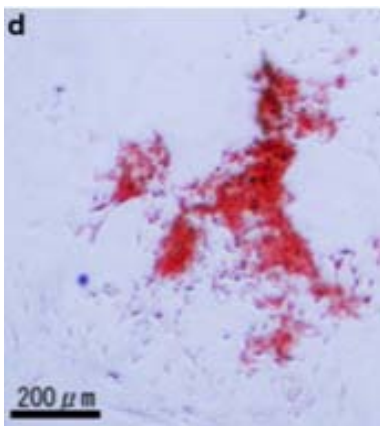


図 4-b HPDL-iPS2 から分化した骨組織

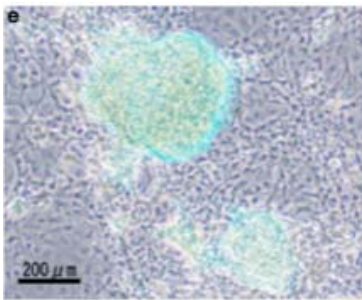


図 5 HPDL-iPS2 から分化した軟骨組織

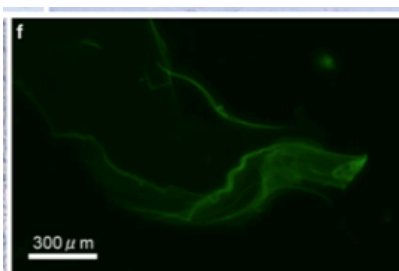


図 5 HPDL-iPS2 から分化した神経組織

HPDL-iPS 細胞が SCID マウスに形成したテラトーマにはさまざまな細胞に分化した組織が混在していた (図 3~5)。

HPDL-iPS 細胞に由来するテラトーマ中に、内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉を含むことが証明された。

また、このテラトーマ中にいくつかの未分化組織像も観察された。

HPDL-iPS 細胞は、ヒト ES 細胞特異的マーカーに反応した (図 6 a, b)。

HPDL-iPS 細胞の染色体核型分析を行ったところ核型異常が高頻度に見られた。HPDL-iPS 細胞は、レトロウイルスによる遺伝子導入を行っている事から、このような事象がベクターの種類に由来するものかどうかをリポソーム法などの新しいベクターで確認する必要がある。

リポソーム法による iPS 細胞の樹立にはまだ成功していないが、現在、条件を検討しながらリポソーム法による iPS 細胞の作製を試みている。

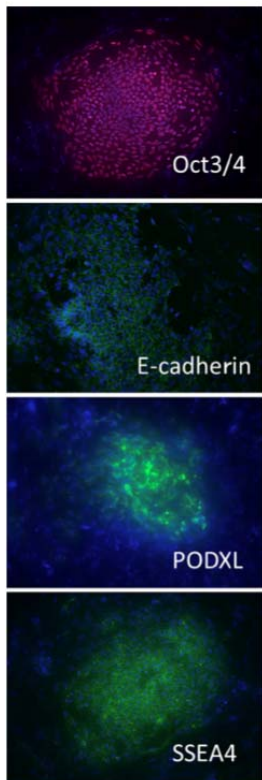


図 6-a 今回樹立した iPS 細胞の免疫染色
(ヒト ES 細胞特異的マーカーに反応した)

このような観点から iPS 細胞の臨床応用には安全性の検討を充分行うことが必要である。リポソーム法など非ウイルス系ベクターによる細胞への遺伝子導入法の開発をその統一した評価方法を確立する必要がある。

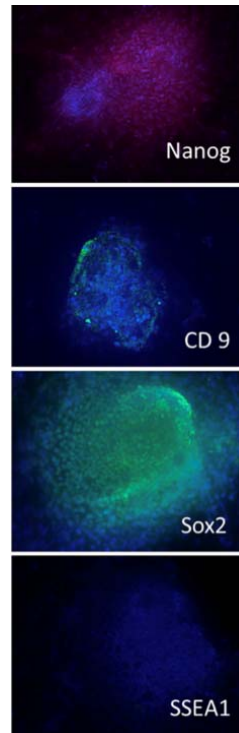


図 6-b 今回樹立した iPS 細胞の免疫染色
(ヒト ES 細胞特異的マーカーに反応した)

現在我々は、市販されている数種類のリポソームを用いたヒト歯根膜細胞由来の iPS 細胞の樹立に取り組んでいる。

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 1 件)

Nomura Y, Ishikawa M, Yashiro Y, Sangarnjanavanich S, Yamaguchi T, Arai C, Noda K, Takano Y, Nakamura Y, Hanada N. Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2012

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 第 53 回歯科基礎医学会総会、岐阜市、*Journal of Oral Biosciences* 53 巻 Suppl. Page152 (2011.09)、ヒト歯根膜線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立 Author: 石川美佐緒, 野村義明, 八城祐一, 新井千博, 山口貴央, 村

田貴俊, 野田晃司, 石川雄一, 花田信弘, 中村芳樹

(2) 第60回日本口腔衛生学会総会、松戸市、
口腔衛生学会雑誌 61巻4号 Page481
(2011.08) iPS細胞の安全性に関する検討、
野村義明, 石川美佐緒, 新井千博, 八城祐一,
野田晃司, 山口貴央, 阿保備子, 角田衣理加,
山田秀則, 今井奨, 中村芳樹, 花田信弘

(3) 第61回日本口腔衛生学会総会、横須賀
市、口腔衛生学会雑誌 62巻2号 Page245
(2012.04) iPS細胞の安全性に関する検討
第2報 核型異常について、野村義明, 石川
美佐緒, 新井千博, 八城祐一, 野田晃司, 山
口貴央, 阿保備子, 角田衣理加, 山田秀則,
今井奨, 中村芳樹, 花田信弘

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花田 信弘 (HANADA NOBUHIRO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：70180916

(2) 研究分担者

野村 義明 (NOMURA YOSHIAKI)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：90350587

今井 奨 (IMAI SUSUMU)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：80072958

(3) 連携研究者

なし