

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390383

研究課題名(和文) ヒト歯髄由来組織幹細胞のステムネス性維持と iPS 細胞の良質化

研究課題名(英文) Study on the stemness of human dental pulp cells and the inductive efficiency for the safty iPS cells

研究代表者

柴田 敏之 (SHIBATA, Toshiyuki)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50226172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト歯髄幹細胞を用いて細胞のステムネス性維持における低酸素の有用性と iPS 細胞誘導効率の関係解明および安全な iPS 細胞の樹立方法を検討した。この成果として低酸素培養(3%O<sub>2</sub>)により、増殖性の向上、初代培養効率の向上が観察され、低酸素培養により stro-1 陽性の細胞の維持と分化能が観察された。さらに、低酸素条件にて iPS 細胞誘導効率の向上が示された。エピソード・プラスミドを遺伝子導入ベクターとして用い、細胞のゲノムに外来遺伝子挿入のないヒト iPS 細胞を効率よく樹立できることを見出した。DLX4 が細胞初期化に重要な役割を担い発現増強により誘導効率が向上した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of hypoxia and cell stemness on the inductive efficiency for the safty iPS cell using human dental pulp cells. Our results were as follows; 1. Hypoxia condition(3%O<sub>2</sub>) improved the cell growth and establishment efficiency of primary culture. Furthermore, hypoxia condition was effective and useful for the maintenance of stro-1 positive cells and high differentiation potency cells and we found out that the hypoxia condition could improve the efficiency of iPS cell induction and its quality. 2. We established the iPS cells efficiently using episomal plasmid as a gene-transferring vector without the foreign gene insertion. 3. We found out that the DLX4 might play an important role in the cell initiation and that the enhancement of the DLX4 expression could induce the highly efficient effect for the iPS cell establishment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：再生医学 歯髄 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 学術的背景

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、歯髄に「組織幹細胞」である 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来ている。我々も、抜歯後の智歯等より得た約 250 ラインのヒト歯髄由来幹細胞を樹立し、DPSC のステムネス性と分化能に関する検討を行って来ている。その結果、継代培養によりステムネス性が喪失すること、DPSC からの iPS 細胞の樹立はヒト皮膚線維芽細胞に比べ 10~100 倍の高い効率を示し、Oct・Sox の 2 因子でも樹立可能であることが示され、有望なリソースであることが示されて来ている。しかしながら、ヒト歯髄幹細胞でも iPS 細胞が誘導されるのは数万個に 1 個の割合に過ぎず、細胞の初期化は未熟な細胞 (ステムネス性の高い細胞) ほど容易とされ、原理的には初期化された細胞は同一の性質・能力を持つと推察されているが、実証はされていないのも現状である。我々は樹立した DPSC のステムネス性維持のため 3% 酸素条件下で DPSC 継代培養した所、歯髄のステムネス性の指標である象牙質のマトリクスタンパク産生能(DMP-1, DSPP)が維持され、骨分化能も維持されていることを見出し、ヒト歯髄組織幹細胞のステムネス性維持に低酸素条件が有用であることを明らかとして来ている。この低酸素での現象を利用することにより組織幹細胞のステムネス性と iPS 細胞誘導効率との関係に一定の回答を出し得るものと考えている。

### (2) 研究の意義

我々のこれまでの研究から、ヒト歯髄由来組織幹細胞(DPSC)の増殖能・分化能は、歯の形成状態及び培養継代数に応じて失われ、また、樹立当初の分化能も、継代 4 代目を超えると低下し再生医療の資源としての価値を著しく損ねしまう現象があり、ステムネス性維持に関わる検討は、せつかく集めた細胞の資源価値を高めるためにも重要な課題と考えられる。この観点からも我々が見い出して来た低酸素培養によるステムネス性維持の検討は、再生医療資源としての DPSC の価値を高める技術の創出に繋がり、その意義は大きいと考えられる。また、本研究の推進により iPS 細胞誘導時における効率の問題、何故同じ様に遺伝子が導入されているにもかかわらず、細胞数万個に 1 個の割合でしか iPS 細胞が出現しないのか等の細胞初期化における機序解明の一助となると考えられる。即ち、細胞初期化時に、混在するステムネス性の高い細胞のみが初期化されていると推察されているが真なのか否なのかが、本研究により示され得ると考えられる。最後に、我々はこれまで口腔がんの悪性化進展とそ

の抑制について検討して来たが、iPS 細胞の克服すべき大きな課題として「がん化」の問題があり、組織・器官発生的な見地のみならず、がん研究の視点からの検討も重要と考えられる。この検討は、発がんおよび安全な iPS 細胞開発へと繋がり、大きな貢献が期待される。

## 2. 研究の目的

我々は、種々の形成段階にあるヒト抜去歯より歯髄組織幹細胞(Dental Pulp Stem Cell: DPSC)を既に 250 ライン程樹立・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歯から得られる DPSC は高い増殖・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を明らかにして来た(J Dent Res. 2008)。また、DPSC のステムネス性は通常の 21%酸素条件ではなく、3%酸素条件の低酸素により維持可能であることが示されて来ている(J Dent Res. 2009)。更に我々は、京都大学山中研究室と共同で、DPSC からの iPS 細胞誘導を試み、iPS 細胞を高率にかつ Oct・Sox の 2 因子の導入でも樹立可能であることを見出し、DPSC が iPS 細胞の供給源として有用であることを示しつつある(Tamaoki et al. J Dent Res. 2009)。そこで、本研究では、我々が保有する種々の年齢・発生段階から得られている豊富なヒト DPSC を用いて、管理する酸素条件の違いによる DPSC のステムネス性と iPS 細胞の樹立効率の差異を比較検証し、「細胞のステムネス性維持における低酸素の有用性と細胞のステムネス性が iPS 細胞誘導効率に關与するか否か」を明らかとし、細胞初期化における基本的な知見を得ることを目指す。また、iPS 細胞では、細胞初期化時に広範な DNA 脱メチル化が生じる現象と以後の「がん化」の問題が大きな課題となっており、「iPS 細胞」=「pre 前がん状態」との観点からの検討も必要と考えられる。本研究では、これまで培ってきたがん研究からの視点で iPS 細胞を観察し、低酸素等による良質・安全な iPS を効率良く生み出す方策も検証する。

## 3. 研究の方法

本研究では、種々の年齢・歯の発生段階からライン化したヒト歯髄幹細胞(DPSC)を用い、各々のヒト DPSC を各々の酸素濃度(3% or 21%)で培養し、そのステムネス性(分化能)の差異と iPS 細胞誘導効率・DNA メチル化異常(がん化)を比較し、[細胞のステムネス性維持における低酸素の有用性と細胞のステムネス性が iPS 細胞誘導効率に關与するか否か、また、良質な iPS 細胞誘導に寄与するか否か]を明らかとする。この結果、再生医療に資する細胞としての最適条件を見出す事を目指す。

(1) ヒト歯髄由来組織幹細胞のステムネス性維持と iPS 細胞効率化・良質化の検証

種々の年齢・歯の発生段階からライン化した歯髄幹細胞を 21%ないし 3%酸素条件下で継代培養し、個々の段階でのステムネス性と iPS 細胞誘導効率を検証する (DPSC から iPS 細胞が樹立可能なこと、低酸素がステムネス性に有利に作用することは確認されているので、差がなかったとしても一定の結論と保存管理に関する知見が確実に得られると考えられる)。

本研究は極めてシンプルな内容ではあるが、種々多様な条件比較を継続する必要があるため、比較検討対象の組み合わせを順次変えて多年度に渡り遂行する。

(2) 低酸素培養条件がヒト歯髄組織幹細胞のステムネス性に及ぼす影響

ライン化している DPSC の中から「歯冠形成期」・「歯根形成期」・「歯根完成期」にある細胞株を選び、これを [3%O<sub>2</sub>] と [21%O<sub>2</sub>] の培養条件下に置き、継代培養を P10 まで進め、P4 時と P10 時の細胞を用い以下の増殖・分化能 (ステムネス性) を両者間で比較検証する。

上記にて、歯の形成状態の相違および継代培養 (P4・P10 間) の相違による比較を行うと共に、各々の系における [3%O<sub>2</sub>] と [21%O<sub>2</sub>] 培養条件の相違がもたらす DPSC の増殖・分化能の変化を検討する。また、これまでに明らかとなっている老化の maker を併せて検証し、関連性を明確化する (ヒト歯髄幹細胞におけるステムネス性の消長と維持のための最適条件を明らかとする)。ここで得た各々の細胞群を用い、以下の検討を展開する。

(3) ヒト歯髄由来 DPSC からの iPS 細胞誘導効率の検討

DPSC では、癌遺伝子 (c-Myc) を除く Oct3/4、Sox2、Klf4 の 3 遺伝子導入後、ES 培地で約 2 週間培養すると右図のような iPS 細胞コロニーが形成される。このコロニー数をカウントし誘導効率をおおまかに検証する。尚、このコロニーは正確には iPS cell like colony と称するもので、真に iPS 細胞化されたか否かは Nanog 等の未分化マーカー等の検証・分化誘導による 3 胚葉系細胞への分化・免疫不全動物での奇形腫形成を確認する必要があるため、樹立した iPS 細胞を順次ストックし多分化能の検討に用いる。

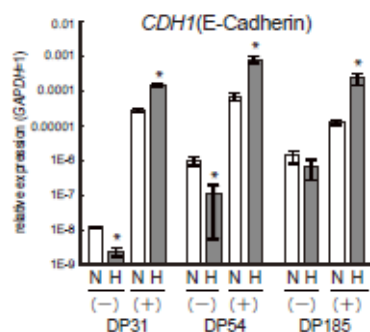
#### 4. 研究成果

本研究では、我々が保有する豊富なヒト歯髄幹細胞 (ヒト歯髄バンク) を用いて、「細胞のステムネス性維持における低酸素の有用性と細胞のステムネス性が iPS 細胞誘導効率に与えるか否か」を明らかとし、細胞初期化における基本的な知見を得ることを目指す。また、iPS 細胞では、以後の「がん化」の問題が大きな課題となっており、「安全な iPS 細胞」の樹立方法を探ることを目的とする。

(1) 低酸素培養 (3%O<sub>2</sub>) により、増殖性の向上、初代培養の樹立効率の向上 (特に高齢者歯髄からの樹立効率の向上) が観察された。また、低酸素培養により stro-1 (未分化マーカー) 陽性の細胞の維持と分化能 (dentine matrix 1 etc の発現維持) が観察された (Archives of Oral Biology, 2010)。

(2) OCT3/4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC, p53shRNA という 6 つの因子をエピソーマル・プラスミドを遺伝子導入ベクターとして用い、細胞のゲノムに外来遺伝子挿入のないヒト iPS 細胞を効率よく樹立できることを見出した。また同時に、上記の樹立方法で、日本人の約 20% への移植適合性を示す HLA 3 座ホモの歯髄細胞 2 株から、外来遺伝子の挿入のない iPS 細胞を樹立し、ドーパミン神経細胞や網膜色素上皮細胞に分化することを確認した (Nature Method, 2011)。

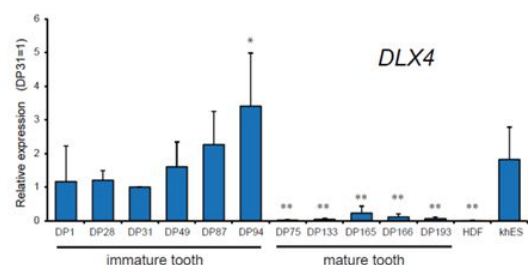
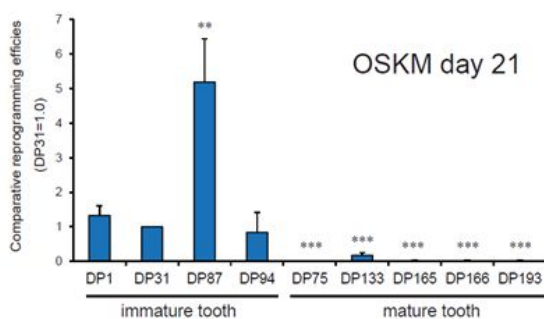
(3) 低酸素培養 (3%O<sub>2</sub>) により、増殖性の向上、初代培養の樹立効率の向上および stro-1 (未分化マーカー) 陽性の細胞の維持と分化能 (dentine matrix 1 etc の発現維持) が観察されると共に、低酸素条件にて iPS 細胞誘導効率および形態の整った iPS 細胞コロニーの形成が観察され、これらは何れも多分化能を有していた。また、iPS 細胞誘導効率向上の機序の一つとして低酸素培養による上皮系マーカー (CDH1: E-cadherin) の発現増強が観察され細胞初期化に EMT (この場合は MET) が関与していることが示された (下図参照)。



CDH1 (E-cadherin) の発現量 (realtime PCR) (DPCs に 4 遺伝子を導入 (+) あるいは未導入 (-) の後、21%O<sub>2</sub> (N) あるいは 3%O<sub>2</sub> (H) 下にて 6 日間培養を行い、RNA を採取した。) CDH1 (E-cadherin) は 4 遺伝子導入によりその発現が増加するが、3%O<sub>2</sub> 下ではその増加割合が大きかった。CDH1 は reprogramming に必須な key 遺伝子と報告されており、この発現量の増大差が今回の iPS 誘導効率上昇の一因と考えられた (J. Dental Res. 2013)。

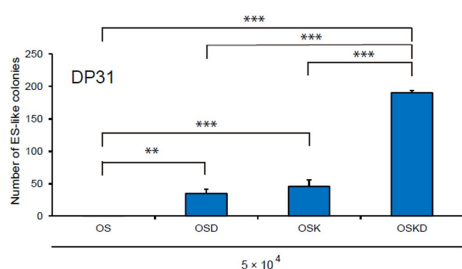
(4) 保有するヒト歯髄細胞の中から iPS 細胞誘導効率の高いラインと低いラインを複数選定し、この細胞群で発現する遺伝子の差を DNA アレイ検索した所、EMT に関わる遺伝子発現 (上皮系の形質発現に関わる遺伝子である DLX4 の関与) が高い程、誘導効率が良い

いことが示された(下図参照)

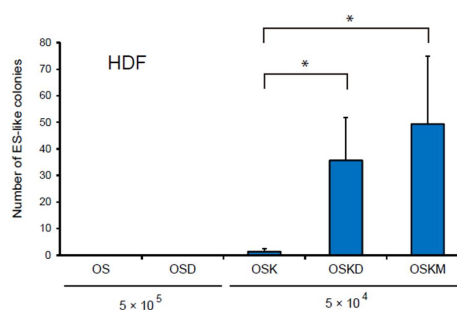


iPS 細胞誘導効率に差異のある細胞群間の比較を行い、DLX4 が高発現している細胞群では誘導効率が有意に高かった。

また、下の図で示す様に DLX4 を Oct/Sox の 2 因子に加えると Oct/Sox/Klf4 の 3 因子導入と同等レベルまで誘導効率が向上し、DLX4 は Klf4 の代替機能を果たしている可能性や、Oct/Sox/Klf4 の 3 因子に DLX4 を加えると誘導効率は更に向上し、Oct/Sox/Klf4/c-Myc の山中 4 因子を導入した場合と同等まで向上する現象を確認し、DLX4 が c-Myc の代替機能も果たすのか?。また、DLX4 を加えた誘導では誘導される iPS 細胞のコロニーが非常に良く整っており均一となっていた(良質化が得られていた)。



さらに、この現象(DLX4 発現増強による iPS 細胞誘導効率の向上)は DPSC のみに見られる現象ではなく、iPS 細胞誘導に広くかつ一般的に用いられているヒト皮膚線維芽細胞でも同様に観察され、かなり普遍的な現象と考えられた(下図参照)。



これらの結果は、現在、投稿準備中である。

## 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 5 件)

以下の論文は全て査読あり

Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Hada M, Yuriguchi M, Aoki H, Tamaoki N, Hatakeyama D, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K.

Hypoxia-enhanced Derivation of iPSCs from Human Dental Pulp Cells.

J Dent Res. 92(10):905-10. 2013

Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Nguyen PT, Siriwardena SB, Tsunematsu T, Ohbayashi M, Ando T, Hatakeyama D, Shibata T, Koizumi K, Maeda M, Ishimaru N, Ogawa I, Takata T.

Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer..

PLoS One.2012;7(8):e44488.

doi: 10.1371/journal.pone.0044488. Epub 2012 Aug 30.

Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S.

A more efficient method to generate integration-free human iPS cells.

Nat Methods. 2011 May;8(5):409-12

Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, Iida K, Kunisada T, Shibata T, Yamanaka S, Tezuka K.

Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking.

J Dent Res. 89(8):773-8. 2010.

Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K.

Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells.

Arch Oral Biol. 55(9):648-54. 2010.

〔学会発表〕(計 12 件)

柴田敏之

ヒト成人歯髄細胞の幹細胞性と iPS 細胞誘導  
第 13 回日本再生医療学会総会 (招待講演)  
2014 年 3 月 4 日  
京都市

玉置也剛、青木仁美、飯田一規、川口知子、  
高橋和利、石崎 明、國貞隆弘、柴田敏之、  
手塚健一

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  
2014 年 3 月 4 日  
京都市

飯田一規、川口知子、玉置也剛、杉山健、  
畠山大二郎、牧田浩樹、柴田敏之  
低酸素培養がヒト歯髄細胞の樹立効率と iPS  
細胞誘導に及ぼす影響

第 58 回日本口腔外科学会総会  
2013 年 10 月 11 日  
福岡市

玉置也剛、川口知子、飯田一規、杉山健、  
畠山大二郎、柴田敏之  
歯髄細胞間における 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  
2013 年 10 月 11 日  
福岡市

川口知子 飯田一規、玉置也剛、畠山大二  
郎、柴田敏之  
動物由来物質・因子を用いないより安全なヒ  
ト歯髄由来細胞の樹立と iPS 細胞化の検討  
第 67 回日本口腔科学会総会  
2013 年 5 月 22 日  
宇都宮市

柴田 敏之

シンポジウム S001 歯髄・歯周組織・骨・  
軟骨の再生医療とその展望  
第 22 回日本歯科医学会総会 (招待講演)  
2012 年 11 月 09 日 ~ 2012  
年 11 月 11 日  
大阪国際会議場 (大阪市)

飯田一規、川口知子、玉置也剛、畠山大二  
郎、牧田浩樹、柴田敏之  
ヒト歯髄細胞の樹立・iPS 細胞化に有用な低  
酸素培養システム

第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会総会  
2012 年 05 月 17 日 ~ 2012 年 05 月 18 日  
広島国際会議場 (広島市)

飯田一規、川口知子、玉置也剛、畠山大二  
郎、柴田敏之  
ヒト歯髄細胞の樹立・iPS 細胞化に及ぼす低  
酸素の影響

第 56 回 日本口腔外科学会総会  
2011 年 10 月 21 日  
大阪国際会議場 (大阪市)

玉置也剛、川口知子、飯田一規、畠山大二  
郎、柴田敏之

ヒト歯髄細胞からゲノムへの遺伝子挿入の  
ない iPS 細胞の誘導

第 65 回 日本口腔科学会総会  
2011 年 4 月 21 日  
タワーホール船堀 (東京都)

⑩飯田 一規、川口知子、玉置也剛、畠山大  
二郎、柴田敏之

ヒト歯髄細胞に関する検討・・・ヒト歯髄細胞  
の発生段階と長期培養におけるステムネ  
ス性の変化 第 64 回 日本口腔科学会総会  
2010 年 6 月 25 日札幌

玉置 也剛、飯田一規、川口知子、高橋和  
利、國貞隆弘、柴田敏之、手塚健一  
iPS 細胞バンクのリソースとしてのヒト歯髄  
細胞の有用性第 10 回 再生医療学会総会  
2011 年 3 月 2 日東京

柴田 敏之

ヒト歯髄細胞のステムネス性維持と iPS 細胞  
リソース第 10 回 再生医療学会総会  
2011 年 3 月 1 日東京

〔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：  
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

柴田 敏之 (SHIBATA, Toshiyuki)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：50226172

(2) 研究分担者

武田-川口 知子  
(TAKEDA-KAWAGUCHI, Tomoko)  
岐阜大学医学部附属病院・医員  
研究者番号：30509815

加藤 恵三 (KATO, Keizou)  
岐阜大学医学部附属病院・講師  
研究者番号： 40397336

牧田 浩樹 (MAKITA, Hiroki)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号： 50345790

畠山 大二郎 (HATAKEYAMA, Daijirou)  
岐阜大学医学部附属病院・講師  
研究者番号： 60377653