

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 5 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890078

研究課題名（和文）ヒト歯髄細胞から良質な iPS 細胞株を効率良く誘導するための基礎的検討

研究課題名（英文）The basic research for the induction of high quality human iPS cells effectively from human Dental Pulp Cells (DPC).

研究代表者

玉置 也剛 (TAMAOKI NARITAKA)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40585303

研究成果の概要（和文）：様々な発達段階の歯由来の歯髄細胞（DPC）株の iPS 細胞への誘導効率を比較検討したところ、歯根完成期の DPC 株の誘導効率が非常に低い傾向であった。DPC 株間の誘導効率の差異は個人差よりも、ドナー歯の発達段階によるものが大きい。またセンダイウイルスベクターを用いて DPC 株から non-integration iPS 細胞が誘導でき、レトロウイルス法で樹立した iPS 細胞と同程度の未分化性と多分可能を有することが分かった。さらに DPC 株はフィーダー細胞として用いることができることがわかり、安全性の向上につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found three new findings. Firstly, human Dental Pulp Cells (DPC) isolated from the tooth of root complete (RC) stage showed much lower reprogramming efficiency than that of DPC isolated from the tooth of crown complete (CC) stage or root forming (RF) stage. This indicated that the efficiency for inducing human iPS cells from DPC lines depend on the developmental stages of the donor tooth. Secondly, we picked up many ES cell-like colonies induced from various DPC lines (isolated from CC, RF, and RC stages) and then evaluated the pluripotency and the differentiation potential. All iPS cell lines tested showed similar levels of pluripotency genes compared to human ES cells, and possessed similar differentiate potency both *in vitro* and *in vivo*. We found that the reprogramming efficiency and the developmental stage of donor tooth do not influence the quality of iPS cells. Lastly, we could induce iPS cells by Sendai virus system from DPC lines without the integration of viral transgenes into the host genome. The pluripotency of iPS cells induced by Sendai virus system were equivalent to human ES cells and the iPS cells induced by retroviral system. In addition to this, we found DPC lines can be used as feeder cells for the induction and maintenance of iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,170,000	351,000	1,521,000
2011年度	1,070,000	321,000	1,391,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,240,000	672,000	2,912,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯髄細胞、iPS細胞、センダイウィルス

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞は患者さん自身の体細胞より、多能性幹細胞を誘導できるため、拒絶反応のない細胞移植治療を可能にするだけでなく、難病疾患の病態解明や創薬の開発など、再生医療以外にも様々な医学分野において、無限の可能性を秘めている。

しかしヒト iPS細胞は、①誘導効率が著しく低い②誘導に用いる体細胞によって誘導効率や、誘導に用いる遺伝子数に差がある③誘導方法の主流がレトロウィルス法であるため、発癌性の可能性があり、安全面で問題があるなどまだ検討すべき点が多い。

我々は、種々の形成段階にあるヒト抜去歯より歯髄細胞(Dental Pulp Cell：DPC)を既に250ライン程樹立・保有し、性質の検証を行って来た。DPCは抜去歯牙から容易に樹立でき、さらに増殖能が高く、培養条件がシンプルであるため、多くのドナーから細胞株を得ることができる。2008年から我々はDPCがiPS細胞バンク構築のためのリソースになりうるか検討してきた。その結果ほとんどのDPC株はヒト皮膚線維芽細胞(HDF)と比べ、高い効率と短い期間でiPS細胞の誘導が可能であった。さらにDPCはOct3/4、Sox2の2因子のみでもiPS細胞の誘導が可能で、これらの結果からDPCはiPS細胞の誘導に非常に適した有望なリソースであることが示唆された。しかし誘導に用いたDPC株のうち、特に歯根完成期の株は非常に誘導効率が低い傾向にあり、これら誘導効率の差はヒト細胞に特有の個人差であるのか、歯の発達段階に起因するものなのかについては今後検討する必要がある。また原理的には誘導効率に差異があっても、誘導されたiPS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。そこで本研究では我々が保有する豊富なDPC株を用いて、iPS細胞化し易いDPC株とし難いDPC株の差異を検討すると共に、誘導されたiPS細胞の

コロニー間の性質の差異を検証し、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、レトロウィルスを用いた現在の誘導方法では、ベクターの染色体への挿入による癌化の危険性が指摘されている。我々は、染色体に影響を及ぼさないセンダイウィルスを用いた方法でiPS細胞の誘導を行っており、両者間の多能性の差異についても合わせて検討し、より安全で良質なiPS細胞の誘導を試みる。

2. 研究の目的

(1) 現在のところヒト iPS細胞の研究は主にセルラインを用いた解析が多い。しかし、マウス細胞に比べ、ヒト細胞では個体差に大きく影響されるため、ヒト iPS細胞バンクの構築をする上では広く多くのドナー細胞から一様にiPS細胞が誘導できるかどうかの検討は必要不可欠である。我々が保有する250株以上のDPC株は、このような比較検討するのに非常に有効な研究材料である。

(2) マウス iPS細胞では誘導に用いる体細胞の組織発生段階の違いが誘導効率に影響を与えているが、ヒト体細胞でも同様のことが当てはまるか、様々な発達段階の歯から得られたDPC株で検討することが必要である。

(3) 初期胚より樹立するES細胞とは異なり、iPS細胞は一度の誘導で多数のES細胞様コロニーが得られるため、良質なコロニーの選別は、iPS細胞バンクの構築にとって重要なポイントの一つである。本研究では誘導されたiPS細胞コロニーから良質なコロニーの選別法を模索したい。

(4) 同一DPC株からセンダイウィルス法で樹立したiPS細胞株とレトロウィルス法で樹立したiPS細胞株の未分化性と多分化能について検討する。また安全性についても検討し、iPS細胞バンク構築にとってセンダイウィルス法は有効な誘導手段であるかどうか検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 様々な歯の発達段階（歯冠完成期、歯根形成期、歯根完成期）と年齢（13歳～60歳）由来のDPC株で誘導効率（コロニーの形成数）を検討する。

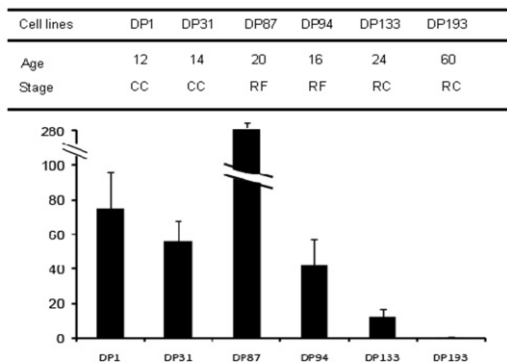
(2) 単一DPC株より誘導されたiPS細胞コロニーをピックアップし、iPS細胞株として樹立後、各コロニー間におけるヒトES細胞に特異的な様々な未分化マーカーの発現量をreal-time PCRにて比較検証する。また、多分化能は胚様体を介した分化誘導や奇形腫形成にて比較検証する。同様の検討を誘導効率が高いDPC株で誘導されたiPS細胞株と誘導効率が低いDPC株で誘導されたiPS細胞株で性質の比較検討する。

(3) 同一DPC株からセンダイウィルス法で樹立したiPS細胞株とレトロウィルス法で樹立したiPS細胞株を用いて(2)で示した方法で未分化性と多分化能を比較検討する。またこれらのiPS細胞株を運動神経細胞に分化誘導し、免疫不全マウスに移植して腫瘍形成の有無（発癌性）について検証する。

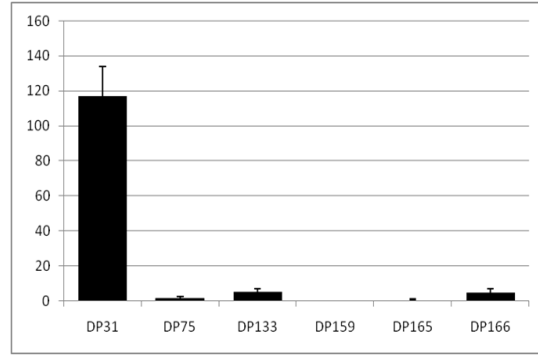
### 4. 研究成果

(1) 様々な年齢、歯の発達段階（歯冠完成期；CC、歯根形成期；RF、歯根完成期；RC）由来のDPC株を用いて誘導効率を検討した。Fig1は4因子（Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc）を用いて誘導されたEs-likeなコロニーを感染後20日後にカウントした。Fig1では歯の形成段階や年齢は誘導効率と相関があることを示唆している。またFig2の様に同様の年齢・歯の発達段階のDPC株間で比べると、それほど個体差は認められず、やはりRC期のDPC株の誘導効率は非常に低い傾向にあった。

(Fig1)



(Fig2)



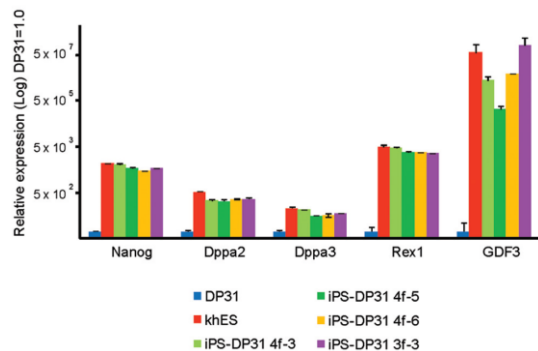
DP31（14/F, CC期）に比べRC期のDPC株は誘導効率が低いことがわかる。Fig2も4因子で誘導し、感染後20日後にコロニーカウントした。

DP75（24/M, RC）、DP133（27/M, RC）、DP159（23/M, RC）、DP165（24/F, RC）、DP166（23/F, RC）

今回の検討ではDPC株間の誘導効率の差は、個体差よりも、由来するドナー歯の発達段階に影響されることが示唆された。

(2) 単一DPC株から得られたES-likeなコロニーをピックアップし未分化マーカーの遺伝子発現量を比べると、ほとんどの遺伝子で著明な差は認められなかった（Fig3）。また誘導効率の高いDP31と低いDP75から誘導されたES-likeなコロニーをピックアップし、同様の解析を行っても、明らかな差は認められなかった。

(Fig3)



DP31から誘導されたiPS細胞株の未分化マーカー遺伝子の発現量をReal-time PCRにて比較したところ、GDFで差があったものの、ほとんどの遺伝子では差がなかった。

(3) 産総研器官発生工学研究所の中西真人先生より分与して頂いたセンダイウィルスベクターを用いて、DPCから高効率で安全なiPS細胞の樹立を目指した。このベクターは山中4因子を1つのベクターに組み込んで

いるため、従来のレトロウイルスベクターでは4因子がランダムに感染して発現量にばらつきができ、性質が異なるiPS細胞が誘導される恐れがあったが、これを改善しより均質な性質のiPS細胞が誘導されるようになる。

センダイウイルス法の誘導効率は、レトロウイルス法と比較すると同程度であった。また、誘導されたiPS細胞株について解析すると、未分化マーカーの発現量、EBを介した*in vitro*の分化能、Teratomaを用いた*in vivo*での分化能について比較しても、まったく異差がなかった。しかし抗センダイウイルスベクターの免疫染色を行うと、誘導されたiPS細胞ではベクターが完全に除去されていることが確認できた。

さらに今回我々はDPC株をフィーダー細胞として使用できることを確認した。このことから、今後患者さん自身の細胞のみで、染色体へのベクター挿入がないiPS細胞の誘導が可能となった。現在センダイウイルス法で誘導されたiPS細胞の安全性について検討を行っている。

#### 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0件)

[学会発表] (計3件)

- ① 玉置 也剛, 飯田 一規, 川口 知子, 畠山 大二郎, 柴田 敏之  
第65回日本口腔科学会 (2011.04.21 東京) 「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」
- ② 玉置 也剛, 高橋 和利, 柴田 敏之, 國貞 隆弘, 山中 伸弥, 手塚 建一  
第10回日本再生医療学会 (2011.03.01 東京) 「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」
- ③ 玉置 也剛, 飯田 一規, 川口 知子, 畠山 大二郎, 柴田 敏之  
第64回日本口腔科学会 (2010.06.24 札幌) 「ヒト歯髄細胞に関する検証 3 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」

[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  
該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 也剛 (TAMAOKI NARITAKA)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40585303