

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592697

研究課題名(和文) センダイウイルスベクターを利用した歯髄細胞からの人工多能性幹細胞誘導方法の検討

研究課題名(英文) Establishment of iPS cell lines from dental pulp cells using Sendai virus vectors

研究代表者

手塚 建一 (TEZUKA, Ken-ichi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50236973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：現在、染色体に組み込まれないベクター系として、京都大学のエピソードプラスミドを用いたものと、産総研およびDNAVEC社のセンダイウイルスベクターを用いた2種類が存在している。われわれは、京都大学と共同で、ヒト歯髄細胞よりエピソードプラスミドベクター法によってiPS細胞を樹立した。本研究では、その成果をふまえて、センダイウイルスベクターを用いた樹立を試み、ヒト白血球抗原(HLA)ハプロタイプホモ iPS細胞の樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：For application of iPS cells for clinical use, safer methods without vector integration are being established. Recently, we used episomal plasmid vector system for this purpose, and succeeded to establish multiple lines in collaboration with Kyoto University. One of the lines were submitted to RIKEN BRC and started to be distributed to other researchers. In this research, we tried to use Sendai virus vector systems to establish iPS cells homozygous for human leukocyte antigens (HLAs). We also tried serum-free method for culturing the cells, and succeeded to establish multiple iPS cell lines.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：歯髄細胞 iPS細胞 センダイウイルスベクター HLAタイプ 再生医療

1. 研究開始当初の背景

2007年に京都大学の山中伸弥教授らによって、ヒト皮膚線維芽細胞から iPS 細胞が誘導された (Takahashi et al. Cell 2007)。ヒト iPS 細胞は、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) と、ほぼ同等の多分化能を持ち、神経、心筋、網膜など、様々な組織を形成する細胞を得ることができる。それゆえ、次世代の医療である、再生医療において、中心的な役割を果たす事が期待されている。

われわれは、性別や年齢の異なるドナーから採取し、HLA タイプが決定された 250 種類以上のヒト歯髄細胞コレクションを有するため、iPS 細胞の誘導が、性別や年齢によって、どのような影響を受けるかについて、検討をすることもできる。将来の再生医療を支えるのは、良質の細胞資源であることは明白であり、実際に幅広いバックグラウンドを持ったドナー細胞を使える点は、われわれの持つ最大の強みである。

通常 HLA は、両親から異なる遺伝子を受け継ぐため、われわれは免疫拒絶に重要な A, B, DR の 3 ローカスだけでも 6 種類の抗原を持っている。しかし、まれに両親から同じタイプの HLA を受け継いだ、3 種類の抗原のみを持った子供が生まれる。これを HLA ハプロタイプホモと呼ぶ。中辻教授らの試算によれば、24000 人から、50 種類のハプロタイプホモ iPS 細胞を得る事ができ、これだけで日本人の 90% に移植可能になると言われている。

2. 研究の目的

われわれは最近、ヒト歯髄細胞から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を効率良く誘導できる事を発見した (Tamaoki et al. J. Dent. Res. 2010)。歯髄細胞からは、ガン遺伝子である、c-Myc を用いなくても iPS 細胞を樹立可能である。しかし、レトロウイルスベクターを使って遺伝子導入をおこなうと、導入遺伝子が染色体に組み込まれてしまい、安全性の点で問題がある。本研究では、染色体に組み込まれない、RNA ベクターであるセンダイウイルスベクターを用いて、より安全な iPS 細胞を、歯髄細胞から誘導するプロトコルを確立する。

3. 研究の方法

(1) センダイウイルスベクターを用いた、歯髄細胞からの iPS 細胞誘導

現在、国内では DNAVEC 社から販売されている、山中 4 因子を別々に発現させるベクターシステムと、産総研の中西先生が開発した、4 因子をひとつのベクターから発現させるシステムが存在するが、その比較実験をおこなう。

(2) HLA ハプロタイプホモ歯髄細胞からの iPS 細胞誘導

(1) で検討した方法を使用して、年齢や性

別の異なる複数の歯髄細胞から、iPS 細胞誘導をおこなう。また、HLA ハプロタイプホモ iPS 細胞バンク構築のために、歯髄細胞バンクの拡充と HLA タイピング、HLA 領域のゲノムエディティングによる HLA ハプロタイプ改変細胞の作製をおこなう。

4. 研究成果

(1) センダイウイルスベクターによる iPS 細胞誘導

産総研、DNAVEC 社のセンダイウイルスベクターシステムを利用して、iPS 細胞を樹立した。未分化マーカー発現、多分化能を確認するとともに、染色体検査をおこない、異常が生じていない事を確かめた。また、無血清培地で培養した歯髄細胞からも、センダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞誘導をおこない複数の iPS 細胞ラインを得た。その効率は、血清入りの培地をもちいて樹立した場合と比べて、ほぼ同程度であった。これらについても、未分化マーカーの発現解析と、テラトーマ形成による多分化能を確かめた。

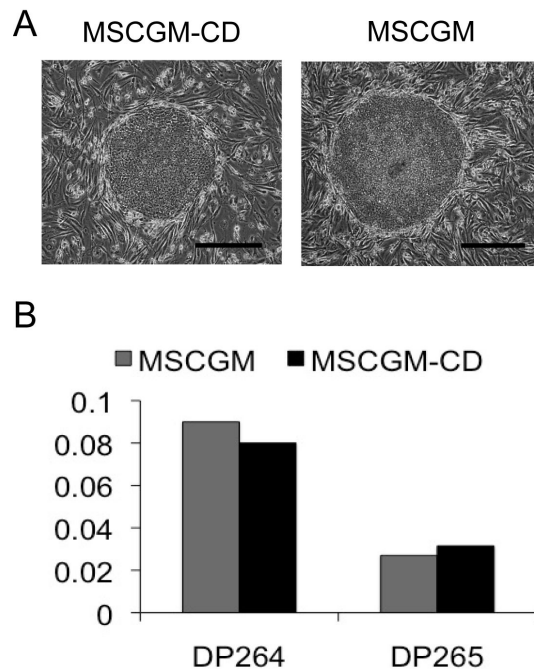


図1 血清入り (MSCGM) および無血清 (MSCGM-CD) 培地で培養した歯髄細胞から誘導した iPS 細胞コロニー (A) と誘導効率 (B)

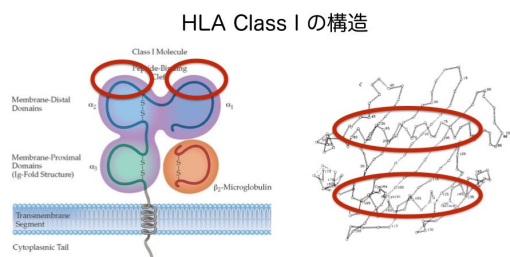
(2) HLA ハプロタイプホモ iPS 細胞の樹立

DP74 (HLA-A*24:B*52:DRB1*15) からプラスミド法により樹立された iPS 細胞株 (454E2) が、理化学研究所バイオリソースセンターより HPS0077 として配布開始された。また、DNAVEC 社のセンダイウイルスベクターを使用し、日本人における出現率 5 位の HLA ハプロタイプホモ細胞 (DP263) から、iPS 細胞を樹立した。

さらに、既存の非ハプロタイプホモ歯髄細胞から、疑似ハプロタイプホモ iPS 細胞を樹立する手段として、日本人での出現度 2 位の

HLA ハプロタイプをホモで持つ iPS 細胞を得るために、HLA ローカスの2ローカスがホモで、A ローカスのみがヘテロの歯髄細胞を選び、Zinc Finger Nuclease (ZFN)による特異的変異導入を試みた。現在までに、4種類のZFNの設計が終了した。そしてZFNを発現させた歯髄細胞で、目的の遺伝子変異が生じて、HLA-A2分子の発現が失われた細胞を得ることができた。

ZFNの設計ストラテジー



HLA間で多様に富む(特異性が高い)
できるだけN末端側(完全欠失変異が見込める)

図2 ZFNの設計ストラテジー 赤で示した領域(Exon2とExon3)をターゲットにして4種類のZFNを設計した。

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) Yoshimura N, Motohashi T, Aoki H, Tezuka K, Watanabe N, Wakaoka T, Era T, Kunisada T.: Dual origin of melanocytes defined by Sox1 expression and their region-specific distribution in mammalian skin. Dev. Growth Differ. 査読有、55, 2013, 270-281
10.1111/dgd.12034
- (2) K. Iida, T. Kawaguchi, M. Hada, M. Yuriguchi, H. Aoki, N. Tamaoki, D. Hatakeyama, T. Kunisada, T. Shibata, and K. Tezuka: Hypoxia-enhanced Derivation of iPSCs from Human Dental Pulp Cells. J. Dental Res. 査読有、92, 2013, 905-910
10.1177/0022034513502204

[学会発表](計12件)

- (1) 手塚 建一: 岐阜歯髄細胞コレクション～未来の再生医療を支えるためにできること～、岐阜歯科学会40周年記念大会(招待講演)、2014年01月12日、岐阜
- (2) Ken-ichi Tezuka: Dental Pulp Cells as Source for iPS Cell Banking - A low cost human cell resource for regenerative medicine-, 5th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry(招待講演)、2013年10月13日、広島
- (3) Ken-ichi Tezuka, Tomoko Kawaguchi,

Naritaka Tamaoki, Kazuki Iida, Hitomi Aoki, Toshiyuki Shibata, Takahiro Kunisada: Dental Pulp Cells as Source for iPS Cell Banking., 2013 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2013年10月04日~2013年10月07日、Baltimore

- (4) 手塚 建一: 親知らずからiPS細胞～歯の中にあるたからもの～、岐阜市母子寡婦福祉大会 講演会(招待講演)、2013年09月23日、岐阜
- (5) 手塚 建一: 再生医療資源としての歯髄細胞利用、歯科基礎医学会 サテライトシンポジウム(招待講演)、2013年09月20日、岡山
- (6) 手塚 建一: 岐阜県が日本を救う?～親知らずからiPS細胞～、岐阜大学フェア(招待講演)、2013年08月22日、高山
- (7) Ken-ichi Tezuka: Dental Pulp Cells as Source for iPS Cell Banking., 6th International Symposium on the Biology of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase(招待講演)、2013年05月27日、神戸
- (8) Ken-ichi Tezuka: Dental Pulp Cells as Source for iPS Cell Banking., CiRA Symposium 2013, 2013年03月11日、京都
- (9) Ken-ichi Tezuka: Dental Pulp Cells as Source for iPS Cell Banking., Kyudai Oral Bioscience 2013 -7th International Symposium(招待講演)、2013年03月08日、福岡
- (10) 手塚 建一: 日本人HLAハプロタイプホモ歯髄細胞コレクション、明海大学歯学部研修会(招待講演)、2013年02月22日、埼玉
- (11) 手塚 建一: 日本人HLAハプロタイプホモ歯髄細胞コレクション、名古屋大学IGER SEMINAR(招待講演)、2013年01月17日、名古屋
- (12) Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Masataka Hada, Akihiro Iida, Mamoru Hasegawa, Kunisada and Ken-ichi Tezuka: Generation of integration-free human dental-pulp-derived iPS cells from HLA-homozygous donors using Sendai virus vectors. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. 2012年06月13日~2012年06月16日、Yokohama, Japan

[図書](計1件)

手塚建一、柴田敏之、國貞隆弘: 朝倉書店、再生医療叢書 第8巻、2012、1-15

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: Efficient method for establishing

induced pluripotent stem cells.

発明者：Tezuka K et al.

権利者：岐阜大学、京都大学

種類：PCT 特許

番号：PCT/JP2008/068320

出願年月日：2013年01月22日

国内外の別：国際特許

名称：人工多能性幹細胞の作製方法

発明者：手塚建一他7名

権利者：岐阜大学、産総研

種類：特許

番号：特願2013-176647

出願年月日：2013年08月28日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 建一 (TEZUKA, Ken-ichi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50236973