

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 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：23592917

研究課題名(和文) ヒト歯髄細胞の遺伝子発現プロファイルとiPS細胞誘導効率の検証

研究課題名(英文) Verification of iPS cell induction efficiency and gene expression profile of human dental pulp cells

研究代表者

畠山 大二郎 (HATAKEYAMA, Daijiro)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60377653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯髄細胞からiPS細胞への誘導効率は歯根完成歯群と比較して歯根未完成歯群で有意に高かった。歯根未完成歯由来歯髄細胞群と歯根完成歯由来歯髄細胞群とのDNAマイクロアレイ解析の結果、平均5倍以上の発現量を認めた遺伝子が28個あった。われわれはDLX4がiPS細胞誘導において新規因子となりうることを明らかとした。さらに、DLX4を用いることはiPS細胞の誘導効率を促進する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Induction efficiency of iPS cells from human dental pulp cells was significantly higher in the root un-formative group compared with the root completed group. The results of the DNA micro array analysis of the root completed group and the root un-formative group, there was twenty-eight gene expression was observed amount of more than five times the average. We have clarified that the DLX4 can be a new factor in the iPS cell induction. Furthermore, the use of DLX4 was suggested to promote the efficiency of inducing iPS cells.

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：ヒト歯髄細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

再生医療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可能と増殖能をもつ「組織幹細胞」の臨床応用が期待され、活発な臨床研究が展開されている。口腔領域においても、ヒト歯髄細胞 (DPC) に「組織幹細胞」の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きている。我々も、DPC が容易に歯髄細胞より単離でき、シンプルな培養条件で高い増殖能を示し、通常の凍結保存により、ほぼ半永久的に保存できることに着目し、2005 年から抜去智歯よりヒト智歯由来幹細胞 (DPC) を樹立してきた。さらに、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) の支援を受けて、250 ライン以上樹立し、組織幹細胞バンクとしての可能性を検討し有望な再生医療資源であることを明らかとしてきた。また、若年者のみならず高齢者の歯髄からも DPC を集積して来ている。

この DPC の特性として、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) と比べて高効率・短期間で iPS 細胞誘導が可能であり、Oct3/4、Sox2 の 2 因子のみでも iPS 細胞誘導が可能で、iPS 細胞化に非常に適したリソース細胞であることも示して来ている。

一般に、iPS 細胞の誘導は、同じ様に山中因子 (c-Mic、Klf4、Oct3/4、Sox2) が遺伝子導入されても数万個に 1 個の割合に過ぎず、細胞の初期化は未分化な細胞 (ステムネス性の高い細胞) ほど容易と考えられている。また、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るが、最近の報告では、iPS 細胞が誘導のオリジナルとなる細胞の DNA 発現プロファイルの差異 (DNA メチル化という形で epigenetic に細胞が制御されている状態の違い) により異なることも報

告されている。

実際、DPC は基本的に高い iPS 細胞誘導効率を示すものの、個体差があり一部の細胞株では HDF と同等の誘導効率にとどまっていることに加え、同一の DPC でも継代により著しく誘導効率が下がること、更には高齢者からの DPC では極度に低下することを見出してきている。この現象を紐解くひとつとして内因性の Klf4 の発現が関与していることを見出して来ている。また、DPC のステムネス性に関しては、継代培養時の Wnt16 の経時的な発現増強と Tpd52 の減弱が、非常に良く相関しており、機序は不明であるが、ステムネス性の良い指標となることも見出して来ている。

本研究は、これらの遺伝子発現様式を手掛かりとして、iPS 細胞の誘導効率の著しく異なる DPC (若年者 DPC・長期継代培養 DPC・高齢者 DPC) を比較検証し、どのような DNA 発現プロファイルを示す細胞が iPS 細胞の誘導に適しているのかを明らかとすると共に網羅的な検証も行い、どのような DNA 発現プロファイルを示す細胞が iPS 細胞のリソースとして最適なのかを明らかとすることを目的としている。本研究の成果は、今後、DPC を再生医療に資する上に於いて非常に意義深いものになると考えられる。

2. 研究の目的

iPS 細胞は、近未来的に再生医療を担うことが期待され多くの研究が展開されている。我々もこれまで、ヒト歯髄細胞 (Dental Pulp Cell: DPC) が有望な iPS 細胞のリソースとなることを報告して来ている。しかしながら、同じ若年者の智歯歯髄を用いても誘導効率に差 (個体差) のあること、同一個体から得られた DPC でも継代培養により低下すること、更には、高齢者より樹立した DPC では極度に低下していることを見出し、この一因として内因性の Klf4 の発現の差異が関与している

可能性を見出して来ている。しかしながら包括的理解は得られないままとなっている。本研究では、既に樹立している種々の DPC 細胞を用い、各々の DNA 発現プロフィールと iPS 細胞誘導効率を検証し、良質な iPS 細胞を効果的に誘導する因子を検証する。

3. 研究の方法

これまでに我々が樹立してきたヒト歯髄細胞 (human Dental Pulp Cell :DPC) を用い、従来のレトロウイルスを用いた方法で、iPS 細胞を誘導する。誘導された iPS 細胞の誘導効率によって、高誘導群と低誘導群とに分け、各群における誘導された iPS 細胞と由来する DPC についての genetic/epigenetic な差異と個体間における差異を解析し、歯髄組織細胞より誘導される iPS 細胞のコロニー未分化性・多分化能についての解析をおこない、これらの結果から、より良質な iPS 細胞を誘導する因子を検証する。

我々は既に、京都大学山中教授との共同研究にて、歯髄細胞株から iPS 細胞の誘導に成功し、誘導に用いたほとんどの細胞株が、従来の皮膚線維芽細胞 (HDF) に比べて著明な誘導効率の上昇が認められたが、一部の細胞株では、皮膚線維芽細胞と同程度かそれ以下の誘導効率であった。そこで、我々が既に樹立している歯髄細胞 (DPC) を用いて、iPS 細胞の誘導を試み、誘導効率の高い DPC と低い DPC 間で、以下の検討を行う。

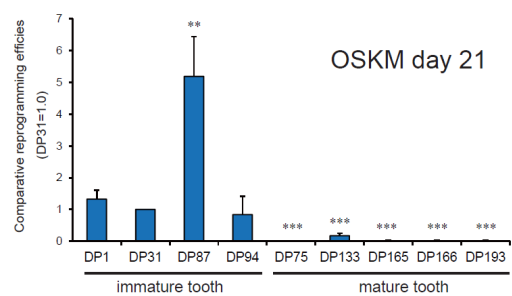
(1) これまでに誘導したものも含めてさらに新たに iPS 細胞への誘導を行い、誘導効率が高い DPC 群と誘導効率が低い DPC 群とに分け、各々の細胞における発現遺伝子の差異を DNA マイクロアレイで網羅的に解析・検討する。

(2) DNA マイクロアレイで発現に差異のある遺伝子と未分化性に関わる遺伝子をター

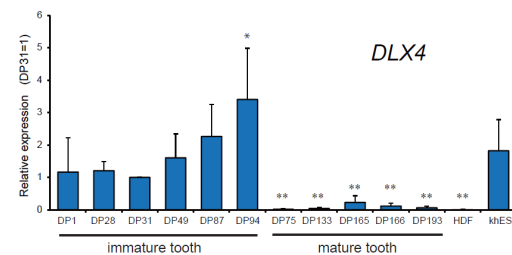
ゲットとして、iPS 細胞への誘導効率が高い細胞群と低い細胞群で精査する。

4. 研究成果

これまでに、我々は歯髄細胞株を 250 株以上樹立し、保有している。これらの細胞株は、様々な性別、年齢、歯の発育段階から得られる。歯髄細胞株からの iPS 細胞への誘導効率は、歯の発育段階に関連していることを明らかとしており、歯根未完成歯由来歯髄細胞群は、歯根完成歯由来歯髄細胞群と比較して有意に iPS 細胞誘導効率が高い。

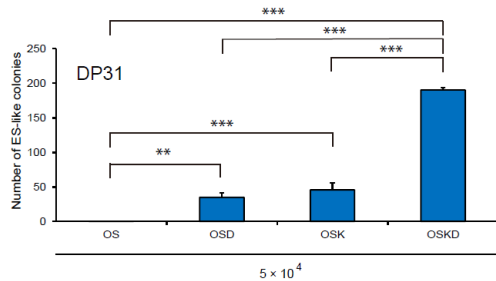


また、OCT3/4 と SOX2 の 2 因子でも iPS 細胞の誘導が可能であった。こうした結果を受け、歯根未完成歯由来歯髄細胞と歯根完成歯由来歯髄細胞とで、DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、歯根未完成歯由来歯髄細胞群で平均 5 倍以上の発現量を認めた遺伝子群を 28 ピックアップした。このうちの DLX4 は、歯根未完成歯由来歯髄細胞群で約 35 倍の発現量を認め、ヒト ES 細胞と同等以上の発現量を示した。



この DLX4 を OCT3/4 と SOX2 の 2 因子とともに歯根未完成歯由来歯髄細胞に遺伝子導入したところ、iPS 細胞誘導効率を有意に促進した。また、OCT3/4、SOX2、Klf4 の 3 因子

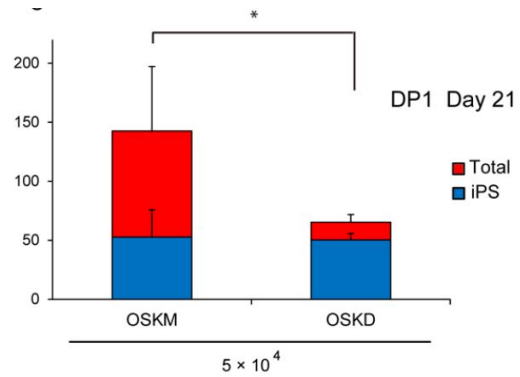
と c-Myc の代わりに DLX4 を用いて遺伝子導入し iPS 細胞を誘導したところ、2 因子導入群よりも、40 倍程度の誘導効率の増加を認めた。



さらに、歯根完成歯由来歯髄細胞へ OCT3/4、SOX2、Klf4 の 3 因子と c-Myc の代わりに DLX4 を用いて iPS 細胞誘導を試みたところ、誘導効率は同程度の誘導効率であった。DLX4 を用いて誘導した iPS 細胞を用いて、未分化マーカーである、REX1 や NANOG などの発現量を解析し、三胚葉への分化を確認したところ、ES 細胞と同程度の未分化性と多分化能を有していた。さらに、DLX4 は、ヒト繊維芽細胞における iPS 細胞の誘導効率も同様に促進した。

これらのことにより、iPS 細胞誘導に於いて、DLX4 が新規因子となりうる事が明らかとなった。

iPS 細胞を誘導する際に、出現した全てのコロニーのうちの一部が、ES 様コロニーとして成長する。この ES 様コロニーが、全コロニーに占める割合を検討したところ、OCT3/4、SOX2、Klf4、c-Myc の 4 因子導入群と比較して、OCT3/4、SOX2、Klf4、DLX4 の 4 因子導入群では、有意に高いことが明らかとなった。



このことは、新規因子 DLX4 を用いることで、良質な iPS 細胞を得る事が出来る可能性を示唆している。

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 1 件)

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. Journal of dental research. 査読有、92(10):905-10.2013

〔学会発表〕(計 8 件)

1) 第 13 回 日本再生医療学会総会(2014 年 3 月 4-6 日 京都市)
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

玉置也剛、高橋 和利、青木 仁美、飯田 一規、川口 知子、畠山 大二郎、位田 雅俊、帖佐 直幸、石崎 明、國貞 隆弘、柴田 敏之、五島 直樹、山中 伸弥、手塚 建一

2) 第 58 回 日本口腔外科学会総会(2013 年 10 月 11-13 日 福岡市)
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

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

3) 第 58 回 日本口腔外科学会総会(2013 年 10 月 11-13 日 福岡市)
歯髄細胞における iPS 細胞への誘導効率の比較検討

玉置也剛、川口知子、飯田一規、杉山 健、畠山大二郎、柴田敏之

4) 第 67 回 日本口腔科学会総会(2013 年 5 月 22-24 日 宇都宮市)
ヒト歯髄細胞の iPS 細胞誘導における低酸素培養条件の検討

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

5) 第 67 回 日本口腔科学会総会(2013 年 5 月 22-24 日 宇都宮市)

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
川口知子、飯田一規、玉置也剛、畠山大二郎、柴田敏之

6) 第 66 回 日本口腔科学会総会(2012 年 5 月 17-18 日 広島市)

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
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

7) 第 56 回 日本口腔外科学会総会(2011 年 10 月 21-23 日 大阪市)

ヒト歯髄細胞の樹立・iPS 細胞化に及ぼす低酸素の影響

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

8) 第 65 回 日本口腔科学会総会(2011 年 4 月 21-22 日 東京)

ヒト歯髄由来細胞からゲノムへの遺伝子挿入のない iPS 細胞の誘導

玉置也剛、飯田一規、川口知子、畠山大二郎、柴田敏之

〔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

畠山 大二郎 (HATAKEYAMA, Daijiro)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 60377653

(2) 研究分担者

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

玉置 也剛 (TAMAOKI, Naritaka)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 40585303

飯田 一規 (IIDA, Kazuki)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30585237

柴田 敏之 (SHIBATA, Toshiyuki)

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50226172

(3) 連携研究者