

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659896
研究課題名（和文） 歯肉を用いた動物細胞/ウイルス・フリーの iPS 細胞技術 - 安全な移植医療に向けて -
研究課題名（英文） Development of virus-free generation and xeno-free culture of human gingiva-derived iPS cells
研究代表者 矢谷 博文 (YATANI HIROFUMI) 大阪大学・大学院歯学研究科・教授 研究者番号：80174530

研究成果の概要（和文）：

細胞移植治療に応用可能な iPS 細胞を作製するには安全性の課題を解決する必要があり、iPS 細胞の樹立に用いるウイルスや動物性フィーダー細胞の回避もその一つである。我々は、患者歯肉を用いて iPS 細胞を作製する際に、ウイルスベクターの代わりにプラスミドベクターを用い、さらに患者の歯肉から培養した細胞を樹立した iPS 細胞のフィーダー細胞として利用する技術を確立した。本研究成果は、動物細胞/ウイルス・フリーの iPS 細胞技術に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

iPS cells are expected to be a powerful tool for regenerative treatments; however, problems that need to be addressed prior to clinical application include viral-vector-derived insertional mutagenesis and the use of animal-derived feeder cells for culture. We generated human gingival fibroblast (hGF)-derived iPS cells with episomal plasmid vectors. The resulting iPS cell clones could be maintained on hGF feeder cells. The virus-free and autologous culture of hGF derived-iPS cells thus represents an important step toward the future therapeutic usage of iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：iPS 細胞・歯肉・ウイルスフリー

1. 研究開始当初の背景

我々は、歯肉から iPS 細胞を効率的に作製することに成功し(江草・矢谷ら. PLoS ONE, 2010), この技術を医療応用に向けて京都大学・山中伸弥教授と共同研究を進めている。細胞移植治療に応用可能な iPS 細胞を作製するには、ウイルスの使用等の安全性の課題を解決する必要があり、iPS 細胞の培養に不可欠なフィーダー細胞の改善もその一つであ

る。最近、皮膚の線維芽細胞のいくつかはフィーダー細胞として機能することが報告されたが(高橋ら. PLoS ONE, 2009), より良質なフィーダー細胞として機能する細胞資源の特定が望まれる。

一方、歯肉線維芽細胞は、口腔粘膜の創傷治癒を早めるなど、他の線維芽細胞とは異なる性質を有することが知られている(Sukotjo ら. J Biol Chem, 2003)。また、そ

の高い増殖能力と採取、培養の容易さから、自己フィーダー細胞としての可能性を大いに秘めている。

また、歯肉の細胞は初期化されやすい性質を有していることから（江草・矢谷ら. PLoS ONE, 2010）、歯肉線維芽細胞を用いることで、ウイルスベクターを用いずにプラスミドベクターを用いてiPS細胞を作製できる可能性が高いと考えた。

これらを背景に申請者は、患者歯肉から採取した歯肉線維芽細胞を、プラスミドベクターを用いた樹立方法でiPS細胞の資源とするのと同時に、この細胞を「自己フィーダー細胞」として用いることで、安全で医療に応用可能なiPS細胞の作製を容易にする技術を着想し、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、患者の歯肉から培養した細胞を、プラスミドベクターを用いた樹立方法でiPS細胞の資源とするのと同時に、フィーダー細胞として利用することにより、動物細胞/ウイルス・フリーのiPS細胞技術を追究することである。

3. 研究の方法

- (1) 大阪大学歯学部附属病院・口腔補綴科を受診の患者を対象に、歯科治療の際に切除された歯肉から、動物由来物質を含まない「線維芽細胞用無血清培養液」を用いて歯肉線維芽細胞が分離培養可能であるか否かを検討した。
- (2) 分離培養した歯肉線維芽細胞を、エピソードプラスミドベクターをエレクトロポレーション法によって導入するiPS細胞誘導法（沖田・山中ら. Science, 2008）に従って初期化誘導し、iPS細胞株の樹立を試みた。
- (3) 分離培養した歯肉線維芽細胞をマイトマイシンCで処理することによって増殖能を不活性化し、これらをフィーダー細胞として用いて、ヒト歯肉線維芽細胞由来iPS細胞の増殖維持（継代培養）について検討した。また、自己フィーダー細胞上で培養されたiPS細胞における未分化細胞マーカーの遺伝子発現をPCR法で、DNAメチル化状態をbisulfiteシーケンス法で解析し、従来のマウスSNLフィーダー細胞で樹立されたヒトiPS細胞と比較検討した。

4. 研究成果

- (1) 患者歯肉からの歯肉線維芽細胞の分離培養は、従来のウシ胎児血清を用いた培地の代わりに線維芽細胞用無血清培養液を用いても可能であることが明らかとなった（図1）。

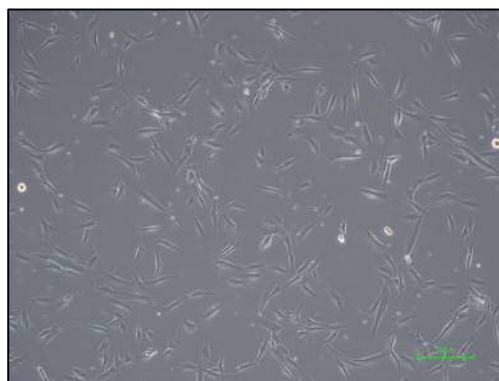


図1 患者歯肉から「線維芽細胞用無血清培養液」を用いて分離培養した歯肉線維芽細胞

- (2) 歯肉線維芽細胞を用いることで、エピソードプラスミドベクターの導入によって、ヒトiPS細胞の樹立に成功した。樹立したiPS細胞は、形態的にES細胞様コロニーを示し、多能性幹細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）に陽性を示すとともに、ES細胞特異的遺伝子の発現を示した（図2）。

ES cell-like colonies

ALP Staining

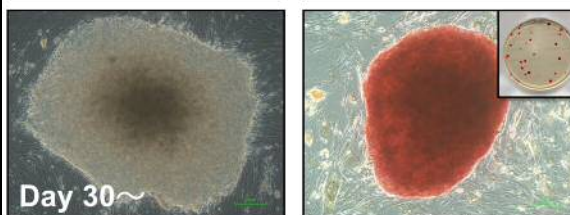


図2 患者歯肉線維芽細胞からエピソードプラスミドを用いて樹立したiPS細胞

- (4) 分離培養した歯肉線維芽細胞は、従来のマウスSNLフィーダー細胞と同様にiPS細胞の培養を維持した。歯肉線維芽細胞をフィーダー細胞として継代培養を重ねたiPS細胞は、ES細胞様のコロニー形態およびALP活性を示し（図3）、未分化細胞マーカーの遺伝子の発現およびDNAメチル化状態を維持していた。

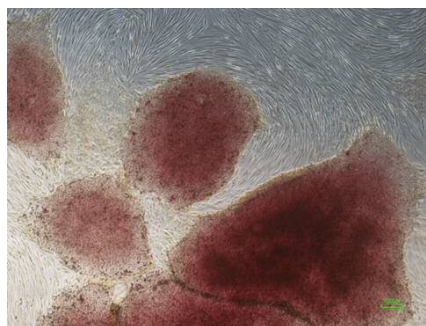


図3 歯肉線維芽細胞をフィーダー細胞に用いて培養したiPS細胞。ALP染色により赤色を呈している。

これらの成果は、本研究目的である動物由来成分およびウイルスフリーのiPS細胞の作製が、患者由来の歯肉線維芽細胞を用いることで可能であることを示唆している。

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3件)

- ① Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-Part II: Clinical applications. Journal of Prosthodontic Research, 56(4): 229-248, 2012. (査読有) doi: 10.1016/j.jpor.2012.10.001.
- ② Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-Part I: Stem cell sources. Journal of Prosthodontic Research, 56(3): 151-165, 2012. (査読有) doi: 10.1016/j.jpor.2012.06.001.
- ③ 江草 宏, 西村一郎. (対談) iPS 細胞と遺伝子診断で進化する再生医療～最先端の Personalized Dentistry. GC Circle : 142 : 4-11 : 2012. (査読無) <http://www.gcdental.co.jp/clinicalconv/pdf/no142.pdf>

[学会発表] (計19件)

- ① Yu G, Egusa H, Wang F, Yatani H. Virus-free and autologous culture system for human gingiva-derived iPS cells. 91th IADR General Session, 2013年3月23日 (米国 Seattle) .
- ② 江草 宏. Application of gingiva derived iPS cell technologies in dental research. University of Washington Bioengineering Departmental Seminar, 2013年3月21日 (米国 Seattle).
- ③ 江草 宏. Application of gingiva derived iPS cell technologies in regenerative dental medicine . International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative 国際シンポジウム (招待講演), 2013年2月16日 (Cha-am, Thailand).
- ④ 江草 宏. Application of gingiva derived iPS cell technologies in dental research. 第60回 国際歯科研究学会 日本部会 (JADR) 学術大会 国際シンポジウム (招待講演), 2012年12月15日 (新潟市).
- ⑤ 江草 宏. Application of gingiva derived iPS cells in bone biology. The

2nd International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference 国際シンポジウム (招待講演), 2012年12月7日 (Chiang Mai, Thailand)

- ⑥ 江草 宏. 歯肉から作る万能細胞 (iPS 細胞) が可能にする歯科医療とは. 神奈川歯科大学学会 研究談話会講演 (招待講演), 2012年11月20日 (横須賀市).
- ⑦ 江草 宏. 歯肉由来 iPS 細胞の歯科医学への応用. 第54回 歯科基礎医学会学術大会シンポジウム (招待講演), 2012年9月14日 (郡山市).
- ⑧ 江草 宏. iPS 細胞の骨生物学への応用. 硬組織再生生物学会 第21回学術大会 (招待講演), 2012年8月25日 (名古屋市).
- ⑨ 江草 宏. Gingiva-derived iPS cells: A promising tool for dental applications. 大阪大学歯学部・大学院歯学研究科「口の難病から挑むライフ・イノベーション」日本・韓国国際シンポジウム (招待講演), 2012年7月13日 (大阪府吹田市).
- ⑩ 江草 宏. Gingiva-derived iPS cells: A promising tool for dental applications. The 90th IADR General Session 国際シンポジウム (招待講演), 2012年6月20日 (Iguacu Falls, Brazil).
- ⑪ 江草 宏. 歯肉由来 iPS 細胞の口腔先端医学への応用. 口腔先端応用医学科学研究会 第4回学術会議 (招待講演), 2012年1月22日 (東京).
- ⑫ 江草 宏. 歯肉を iPS 細胞源とする歯科医療技術の創成. 日本歯科医学会 第28回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」(指定演者), 2012年1月7日 (東京).
- ⑬ 江草 宏. 歯肉のあらたな可能性—歯肉から万能細胞 (iPS 細胞) を作る—. 大阪大学歯学部創立60周年記念 オープンフェスタ in Suita (招待講演), 2011年10月16日 (大阪府吹田市).
- ⑭ 江草 宏. 歯茎から作れる万能細胞～iPS 細胞で夢の再生医療へ～. 大阪大学歯学部60周年記念事業 第9回市民フォーラム (招待講演), 2011年10月15日 (大阪市).
- ⑮ 江草 宏. Gingiva-derived iPS cells: A promising tool for dental applications. The 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry 国際シンポジウム (招待講演), 2011年10月8日 (広島市).
- ⑯ 江草 宏. 歯肉のあらたな可能性—医療応用に有望な iPS 細胞源—. 日本口腔インプラント学会 第41回学術大会 (招待講演), 2011年9月17日 (名古屋市).
- ⑰ 江草 宏. 口腔粘膜歯肉を用いた iPS 細胞の樹立および骨生物学への応用. 日本骨代謝学会 第29回学術集会 若手シンポジ

ウム (招待講演), 2011年7月30日 (大阪市).

- ⑱ 江草 宏. The Impact of Gingival Fibroblast-Derived iPS Cells in Dentistry . The 3rd Thailand International Conference on Oral Biology 国際シンポジウム (招待講演), 2011年5月26日 (Bangkok, Thailand).
- ⑲ 江草 宏. 歯肉を iPS 細胞源とする補綴歯科治療の可能性. 日本補綴歯科学会 第120回学術大会シンポジウム (招待講演), 2011年5月21日 (広島市).

[その他]

報道関連
新聞

- ① 毎日新聞: 夢を現実に 続く挑戦—歯ぐき 捨てずに生かす・iPS 細胞活用 (2011年11月8日)

受賞

- ① 江草 宏. 国際歯科研究学会 (IADR) Distinguished Scientist Award (Young Investigator Award), 2012年6月20日.
- ② 江草 宏. 大阪大学功績賞, 2011年8月1日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢谷 博文 (YATANI HIROFUMI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 80174530

(2) 研究分担者

江草 宏 (EGUSA HIROSHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 30379078

(3) 研究協力者

于 冠男 (YU GUANNAN)
大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生
研究者番号: なし