

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23792328

研究課題名(和文)高齢者のヒト歯髄細胞からiPS細胞を効率よく樹立するための基礎的検討

研究課題名(英文)Research about derivation of iPS cells from old patients' dental pulp cells

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト歯髄細胞(dental pulp cell;DPC)からiPS細胞誘導を行う過程において、低酸素を限られた期間のみ使用し、その誘導効率を上げることに成功した。この方法は、若年者のDPCのみならず、樹立効率の低い高齢者のDPCにも有用であり、iPS細胞による再生医療を高齢者に用いる上で、自家移植の可能性を高めた。また、この方法は、線維芽細胞を用いた既発表の論文とは低酸素培養の条件(期間)が異なるものであり、細胞により条件の検討が必要であることを示し、iPS細胞研究にも寄与したものと考える。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia enhances the reprogramming efficiency of human dermal fibroblasts to become induced pluripotent stem cells (iPSCs). Because we showed previously that hypoxia facilitates the isolation and maintenance of human dental pulp cells (DPCs), we examined here whether it promotes the reprogramming of DPCs to become iPSCs. Unlike dermal fibroblasts, early and transient hypoxia (3% O₂) induced the transition of DPCs to iPSCs by 3.3- to 5.1-fold compared with normoxia (21% O₂). The resulting iPSCs closely resembled embryonic stem cells as well as iPSCs generated in normoxia, as judged by morphology and expression of stem cell markers. Therefore, we conclude that hypoxia, when optimized for cell type, is a simple and useful tool to enhance the reprogramming of somatic cells to become iPSCs.

研究分野：口腔外科学

キーワード：再生医療 歯髄細胞 iPS細胞 低酸素

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに今後の再生医療への貢献を目的に、医療廃棄物として処理されていた抜歯後の智歯より200ライン以上の歯髄細胞 (Dental Pulp Cell: DPC) を樹立した。若年者の智歯、とりわけ未成熟の智歯から得られた DPC は高い増殖能と分化能 (ステムネス性) を有していたが、継代培養をするにつれこのステムネス性が低下することが明らかとなり (文献 1,2)、ステムネス性の維持が重要な検討対象となった。そこで、DPC を低酸素下 (3%O₂) で培養したところ、増殖能が向上し、組織量が少なく採取・樹立が困難であった高齢者の抜去歯からも、DPC を効率的に樹立することが可能となった。また、ステムネス性も維持されることがわかった (文献 3)。

近年、iPS 細胞を再生医療へ応用するための検討が多く施設で行われ、我々も若年者の DPC から iPS 細胞への誘導を試み、高率に誘導することに成功し、DPC が iPS 細胞の供給源として極めて有用であることを示した (文献 4)。しかしながら、高齢者の DPC から iPS 細胞への誘導では、誘導効率が若年者に比べて極めて低く、再生医療へ活用するためには誘導効率の向上が必要不可欠であった。そこで我々は、若年者のヒト線維芽細胞から iPS 細胞誘導を行う際に、低酸素濃度下での培養により、誘導効率が向上したという報告 (文献 5) に注目し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、高齢者から得られた DPC を iPS 細胞へ誘導する過程において、低酸素下での培養が有効であるかを検証するとともに、iPS 細胞化に最適な誘導条件についても検討を行い、誘導効率の向上を目指す。また、高齢者から得られた DPC の iPS 細胞化効率が低い理由や低酸素が DPC に与える影響についても検証する。

3. 研究の方法

(1) 岐阜大学大学院医学系研究科にて倫理審査委員会の指針に従って、研究協力の同意の得られた患者の歯牙から樹立した DPC 株を用いる。DPC を低酸素培養下で iPS 細胞へ誘導し、最も高率に樹立し、安定して継代培養のできる培養条件を検討する。

iPS 細胞への誘導は、山中研究室より技術移転された、従来のレトロウイルス法による遺伝子導入を用い、DPC に 4 遺伝子 (Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc) を導入する。形成されたコロニーは形態とアルカリフォスファターゼ染色により ES 細胞様コロニーを iPS 細胞コロニーとして計測する。

(2) 低酸素条件下で樹立された iPS 細胞の正常解析を行い、性質の違いがあるかを検証する。

- ・長期培養での増殖曲線。
- ・real time PCR および免疫染色による未分化マーカー・分化マーカーの発現を検討する。
- ・EB を介した分化誘導を行い、三胚葉系の細胞 (神経、筋肉、腸管上皮) マーカーの発現を解析する (免疫染色、real time-PCR)。
- ・免疫不全マウスへ移植し、三胚葉組織を有するテラトーマへの形成能を評価する。

(3) 低酸素培養下での DPC の性状解析を行い、得られた結果のメカニズム考察を行う。

4. 研究成果

DPC の培養に最適な低酸素濃度については先に発表した論文を参考に (文献 3)、3%O₂ と仮定し、通常酸素濃度 (21%O₂) との比較を行った。DPC から iPS 細胞への誘導は、山中氏らが用いた従来のレトロウイルス法により、Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の 4 遺伝子を導入した。この方法では、レトロウイルスによる遺伝子導入、フィーダー上での維持培養の 2 つのステップがあり、それぞれの期間を低酸素にすることにより、iPS 細胞への誘導効率がどのように変化するのかを検討した。使用した DPC 株は若年者の DP31 (14yrs)、DP54 (19yrs) と高齢者の DP185 (62yrs) を選択し、生じた現象が幅広い年齢層で普遍的であることを確認できるようにした。

iPS 細胞へ誘導を行い、上記の期間を 3%O₂ にしたところ、の期間の酸素濃度に関係なく、iPS 細胞誘導が強く抑制されることが分かった。一方で、の期間を 21%O₂ とし、

の期間を 3%O₂ (図 1 の H) または 21%O₂ (N、すなわち通常条件) としたところ、ES 細胞様コロニーが 3.3~5.1 倍に、アルカリフォスファターゼ陽性細胞コロニーが 1.9~3.2 倍に増加した (図 1A)。未分化マーカーである Nanog の発現量も 3%O₂ の方が有意に高かった (図 1B)。すなわち、期間を 3%O₂ に、期間を 21%O₂ にすることで、iPS 細胞への誘導効率を上昇させることができる。

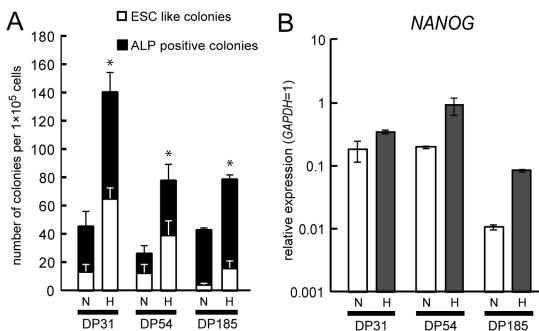


図 1 低酸素培養下での iPS 細胞誘導

このようにして低酸素培養下で作成された iPS 細胞は、ES 細胞様の形態を呈し (図 2A)、アルカリフォスファターゼ活性を認め (図 2B)。また、免疫染色では、ES 細胞の

未分化マーカーである Oct3/4・SSEA4・TRA1・TRA81 が発現し、分化マーカーである SSEA1 は発現していなかった (図 2C-G)。Real-time PCR 法では、未分化マーカーである Oct3/4・Klf4・Sox2 (いずれも内因性のもの) と Rex1 の発現量が、ES 細胞や 21%O₂ 下で作成した iPS 細胞と同等であることを確認した (図 2H)。さらに、得られた iPS 細胞をヌードマウスの精巣に移植したところ、テラトーマが形成され、三胚葉組織が形成されることを確認した (図 2I-K)。これらの結果から、低酸素培養で樹立された iPS 細胞は ES 細胞や通常酸素条件下で樹立した iPS 細胞と同等の未分化性と多分化能を有していることが分かった。

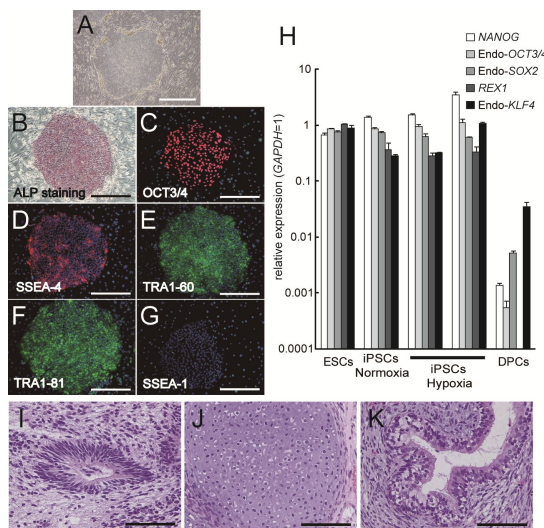


図 2 低酸素培養下で樹立した iPS 細胞の性状解析

低酸素培養により iPS 細胞の樹立効率が高まったメカニズムを検証するため、低酸素培養下 DPSC の遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて比較した (図 3)。

Table 1. Genes Upregulated (Hypoxia-Normoxia) or Downregulated (Hypoxia-Normoxia) by >5-fold

Hypoxia-Normoxia			Hypoxia-Normoxia		
Gene Symbol	GeneBank Accession Number	Foldincrease	Gene Symbol	GeneBank Accession Number	Foldincrease
ANKRD24	NM_123475	38.43	CKCR3	NM_001504	10.91
CBL	NM_012116	30.23	AKRN3	NM_005664	10.65
GPR2	NM_001495	25.99	GTSF1	NM_144594	7.29
ATPA	NM_006045	17.16	CKX1	NM_001511	7.22
EGUN3	NM_022073	12.33	CPA2b	NM_001869	7.14
SOXB1	AK022468	8.91	RG31b	NM_130782	6.28
ANGPT4	NM_129314	8.88	OLAH	NM_001039702	6.20
LEA3	NM_006865	8.81	FTM	NM_177478	6.14
PTPR	NM_002837	7.96	IL8	NM_000584	5.74
SFR1	NM_005411	7.95	KRTAP3-2	NM_031959	5.11
CCR4	NM_005508	7.38			
OCIN	NM_002538	7.12			
SMPD3	NM_018667	7.02			
CAP	NM_001216	6.45			
IGFBP3	NM_001013998	6.37			
INH8	NM_002193	6.34			
CDH1	NM_004360	5.75			
ADP1	NM_198098	5.56			
FAM189A2	NM_004816	5.45			
MCHR1	NM_005297	5.30			
ARX	NM_017413	5.18			

図 3 低酸素培養下での DPSC の遺伝子変化

低酸素下で発現上昇するものとして、我々は CDH1 (E-cadherin) に注目した (図 4: real-time PCR でも確認した)。CDH1 は上皮系の分化マーカーであり、iPS 細胞へリプログラミングされる上で、間葉上皮移行の重要な因子の一つであることが報告されている (文献 6)。そのため、今回の現象のメカニ

ムとして、低酸素が DPSC の間葉上皮移行を促すように働いたと考えられた。

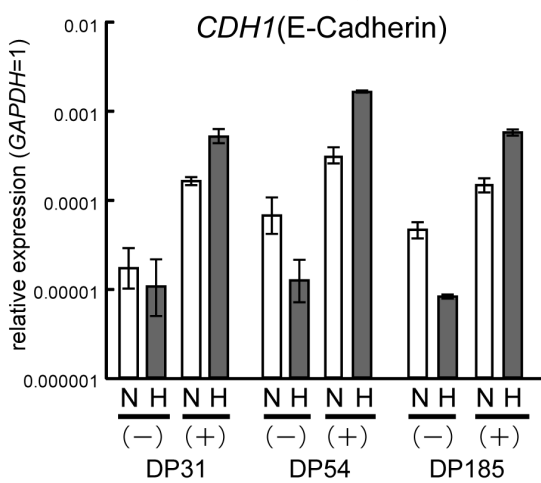


図 4 低酸素培養下での DPSC の CDH1 発現量

また、本研究ではリプログラミングの促進因子として mir-302 にも注目し (文献)、microRNA の解析も行ったが、有意な結果を得ることはできなかった。

本研究では、DPSC から iPS 細胞誘導を行う過程において、低酸素を限られた期間のみ使用し、その誘導効率を上げることに成功した。この方法は、若年者の DPSC のみならず、樹立効率の低い高齢者の DPSC にも有用であり、iPS 細胞による再生医療を高齢者に用いる上で、自家移植の可能性を高めた。また、この方法は、線維芽細胞を用いた既発表の論文 (文献 5) とは低酸素培養の条件 (期間) が異なるものであり、細胞により条件の検討が必要であることを示し、iPS 細胞研究にも寄与したものと考える。

<引用文献>

Gronthos S, Mankani M, et al. "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." PNAS 97(25), 13625-13630, 2000.

Takeda K, Tezuka K, et al. "Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs." J Dent Res 87(7), 676-681, 2008.

Iida K, Tezuka K, et al. "Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells." Arch Oral Bio 55, 648-654, 2010.

Tamaoki N, Tezuka K, et al. "Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking." J Dent Res 89(8), 773-778, 2010.

Yoshida Y, Yamanaka S, et al. "Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells." Cell Stem Cell 5(3), 237-41, 2009.

Chen T, Ling K, et al. “E-cadherin mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation.” Stem Cells 28:1315-1325, 2010

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Iida K, Tezuka K, et al.
“Hypoxia-enhanced derivation of iPSCs from human dental pulp cells.” J Dent Res 92(10), 905-910, 2013. 査読あり
DOI:10.1177/0022034513502204

〔学会発表〕(計 4 件)

飯田一規、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、日本口腔外科学会総会、2013 年 10 月 13 日、福岡国際会議場（福岡市）

飯田一規、ヒト歯髄細胞の iPS 細胞化に有用な低酸素培養、日本口腔科学会総会、2013 年 5 月 23 日、栃木県総合文化センター（宇都宮市）

飯田一規、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、日本口腔科学会総会、2012 年 5 月 17 日、広島国際会議場（広島市）

飯田一規、ヒト歯髄細胞の樹立・iPS 細胞化に及ぼす低酸素の影響、日本口腔外科学会総会、2011 年 11 月 21 日、大阪国際会議場（大阪市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

飯田 一規 (IIDA, Kazuki)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30585237