

## 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 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792439

研究課題名（和文） 乳歯歯髄細胞由来 iPS 細胞を用いた遺伝子工学的的手法による歯髄幹細胞の単離

研究課題名（英文） Isolation of dental pulp stem cells from iPS cells induced by human deciduous tooth dental pulp cells using genetic engineering procedure

研究代表者

齊藤 一誠 (SAITOH ISSEI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90404540

## 研究成果の概要（和文）：

まずは iPS 細胞樹立時に必要とされる feeder 細胞について、複数の異なる薬物耐性を持つ feeder 細胞を樹立した。2 種類の薬剤耐性遺伝子を持つプラスミドを作成し、SHB 細胞、SPB 細胞、SNB 細胞を樹立した。薬剤選別にて、いずれの細胞も STO 細胞とほぼ同じ細胞形態をしており、18 継代以上の長期間培養維持が可能であった。また、樹立細胞上に播種されたマウス ES 細胞については、形態学的には変化は認められず、良好な継代維持が可能であった。次に、口腔組織由来細胞の初代培養では、特に細菌類が培養系にコンタミする場合が多いことから、歯髄細胞の初代培養時のコンタミについて検討した。STO 細胞と共培養すると、初代培養系のコンタミの可能性を減少させることが可能であった。

次に歯髄細胞を用いて 4 因子にて乳歯由来 iPS 細胞の樹立に成功した。さらに歯髄幹細胞特異的プロモーターを持つプラスミドを乳歯由来 iPS 細胞に遺伝子導入し、組み換え iPS 細胞を樹立した。この iPS 細胞をヌードマウス皮下に移植し、奇形腫を作製し、それを初代培養に移した。しかしながら、neomycin を含む培地にて培養後、歯髄幹細胞を選別したが、目的の細胞を取得することができなかった。原因としては、プロモーターの発現、奇形腫での *in vivo* 分化誘導の不確実性が考えられたため、遺伝子導入法の再検討とスキャフォールドなどでの分化の方向付けができる材料を用いるなどの検討を今後行う予定である。

## 研究成果の概要（英文）：

First, we generated a set of gene-engineered STO feeder cells that confer to resistance to several commercially available drugs. The STO cells were transfected with pcBIH (carrying bleomycin resistance gene (*ble*) and hygromycin B phosphotransferase gene (*Hyg*), pcBIP (carrying *ble* and puromycin resistance gene (*puro*)) or pcBSN (carrying *ble* and neomycin resistance gene (*neo*)). The resulting stably transfectants (termed SHB for pcBIH, SPB for pcBIP and SNB for pcBSN) exhibited bleomycin/Hygromycin, bleomycin/puromycin or puromycin/neomycin, as expected. The morphology of these cells passaged over 18 generations was indistinguishable from that of parental STO cells. Of isolated clones successfully supported the growth of mouse ES cells in an undifferentiated state, when co-culture was performed. Next, we examined the possibility that STO cells could phagocytose *Streptococcus mutans* (a bacteria causing tooth decay), which always contaminates cultures of primarily isolated human deciduous dental pulp cells (HDDPCs). There was no bacterial contamination in the cultures containing STO cells supplemented with mitomycin C (MMC).

HDDPCs can be reprogrammed using 4 reprogramming factors, and dental-pulp-stem-cell (DPSC) specific promoter was transfected to HDDPC-derived iPS. For teratoma formation,

recombinant HDDPC-iPS cells were injected subcutaneously into immune compromised mice. The teratoma was dispersed into primary culture, and we tried to select DPSC under the basic medium supplemented neomycin. Unfortunately, we were unable to gain DPSC because of the uncertainty of promoter expression and differentiation in vivo. We will review our transfection procedure and try to use the materials like scaffold in the future.

#### 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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学

#### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は、繊維芽細胞等の分化細胞に 4 つの **reprogramming factor** 遺伝子を導入して得られ、ES 細胞と同等のポテンシャルを持つ細胞である<sup>3)</sup>。iPS 細胞は *in vitro* で無限に増え、且つ様々な分化細胞を生む。この点では、研究や臨床応用での細胞の不足を解消するに足る利点を有する。歯髄細胞からの iPS 化は既に岐阜大で達成されている<sup>4)</sup>。彼らの研究から判った興味深い知見として、表皮繊維芽細胞に比べ、歯髄細胞からは  $10^3$  倍高い効率で iPS 細胞が得られたという点である。理由は未だ不明だが、歯髄細胞はかなり未分化な細胞で構成されていると考えられる。一方、iPS 細胞から歯髄幹細胞のようないわゆる組織（体性）幹細胞が樹立されたという報告は未だ無い。従って、iPS 細胞からの効率的な歯髄幹細胞の分化誘導、その単離・濃縮法の開発が求められている。

#### 2. 研究の目的

歯科臨床において、抜去乳歯は子どもの記念に保存する以外はほとんど廃棄されている。しかし、バイオリサイクルの観点から、乳歯は歯髄幹細胞の有効な細胞供給元となり得る。そこで、本研究は、乳歯由来の再生医療への応用を目指し、乳歯歯髄幹細胞から 1) 遺伝子工学的手法を用いて、多能性幹細胞である iPS 細胞を樹立すること、2) iPS 細胞から乳歯歯髄幹細胞への *in vivo* 分化誘導法を確立することを目的としている。

#### 3. 研究の方法

本研究は、交換期に抜去された乳歯の歯髄細胞を用いて、iPS 細胞を作製し、これを基に歯髄幹細胞の樹立法の確立を目指す。

乳歯歯髄細胞から iPS 細胞を樹立し、歯髄幹細胞特異的プロモーター、緑色蛍光遺伝子、neomycin 耐性遺伝子(neo)と Hygromycin 耐性

遺伝子(hyg)を持つプラスミドを作製する。樹立した iPS 細胞にプラスミドを遺伝子導入し、薬剤耐性 feeder 細胞上にて Hygromycin B を含む培地で培養し、組み換え iPS 細胞を選別する。

組み換え iPS 細胞をヌードマウス皮下に移植し、奇形腫を作製する。次いで奇形腫を初代培養に移し、neomycin (G418)を含む培地にて培養後、歯髄幹細胞を選別する。

#### 4. 研究成果

iPS 細胞樹立時に必要とされる feeder 細胞について、複数の異なる薬物耐性を持つ feeder 細胞を樹立することができた。STO 細胞に、bleomycin 耐性遺伝子と hygromycin B 耐性遺伝子をプラスミドを用い、遺伝子導入し、両薬剤に耐性を持つ SHB 細胞を、同様に、bleomycin 耐性遺伝子と puromycin 耐性遺伝子を、bleomycin 耐性遺伝子と neomycin 耐性遺伝子を持つ SPB 細胞および SNB 細胞をそれぞれ樹立した。これらの細胞を feeder として、マウス iPS 細胞の樹立も可能であることも確認した。

口腔組織由来細胞の初代培養では、特に細菌類が培養系にコンタミする機会が多いことから、口腔組織由来細胞の効率的かつ確実な初代培養法の検討を行った。結果として、STO 細胞と共培養すると、初代培養系のコンタミの可能性を減少させることが可能であった。また、細胞の増殖を促進する効果も確認することができた。本結果から、初代培養系のコンタミのリスクを低減する手技を開発できたことで、iPS 細胞の cell source となる乳歯歯髄細胞の取得が容易になった。

次に乳歯歯髄細胞を用いて 4 因子にて乳歯由来 iPS 細胞の樹立時に、feeder 細胞が与える影響について検討を行った。樹立直後はコロニーの形態が安定せず、ALP のタンパク発現も微弱であった。10 継代からは安定する傾

向が認められた。

また、乳歯由来 iPS 細胞から、歯髄幹細胞特異的プロモーターを遺伝子導入した組み換え iPS 細胞を樹立した。この iPS 細胞をヌードマウス皮下に移植し、奇形腫を作製し、それを初代培養に移した。しかしながら、neomycin を含む培地にて培養後、歯髄幹細胞を選別したが、目的の細胞を取得することができなかった。原因としては、プロモーターの発現、奇形腫での in vivo 分化誘導の不確実性が考えられたため、遺伝子導入法の再検討とスキャフォールドなどでの分化の方向付けができる材料を用いるなどの検討を今後行う予定である。

#### 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 4 件)

(1) Issei Saitoh, Masahiro Sato, Yoko Iwase, Emi Inada, Toshiki Nomura, Eri Akasaka, Youichi Yamasaki, Hirofumi Noguchi: Generation of mouse ST0 feeder cell lines that confer resistance to several types of selective drugs. *Cell Medicine*, 3(1); 97-102, 2012. (査読有)  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639414>

(2) Masahiro Sato, Eri Akasaka, Issei Saitoh, Masato Ohtsuka, Satoshi Watanabe: In vivo gene transfer in mouse preimplantation embryos after intraoviductal injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(5); 278-287, 2012. (査読有)  
DOI: 10.3109/19396368.2012.688088

(3) Masahiro Sato, Eri Akasaka, Issei Saitoh, Masato Ohtsuka, Satoshi Watanabe: Development of a technique for efficient gene transfer to antral follicular cells in the mouse ovary. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(3); 136-141, 2012. (査読有)  
DOI: 10.3109/19396368.2012.656796.

(4) Masahiro Sato, Eri Akasaka, Issei Saitoh, Masato Ohtsuka, Shingo Nakamura, takayuki Sakurai, Satoshi Watanabe: A simplified protocol for the semi-large scale recovery of plasmids from *Escherichia coli* grown on agar plates. *Journal of Biomedical Science and*

*Engineering (JBiSE)*, 5(7); 406-408, 2012.  
(査読有)  
DOI: 10.4236/jbise.2012.57051

[学会発表] (計 8 件)

(1) 佐藤正宏, 赤坂恵理, 齊藤一誠, 大塚正人, 渡部聡: マウス成熟卵細胞細胞への生体内遺伝子導入法の開発, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡市 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡), 2012. 12. 11-12. 14

(2) 齊藤一誠, 稲田絵美, 村上智哉, 山崎要一, 野口洋文: 初代歯髄細胞培養における feeder 細胞の有用性, 第 39 回日本臓器保存生物医学会学術集会, 福島市 (コラッセふくしま), 2012. 11. 16-17.

(3) 乃村俊樹, 齊藤一誠, 稲田絵美, 長谷川大子, 松本裕子, 窪田直子, 山崎要一: 初代ヒト乳歯歯髄細胞における幹細胞特異的遺伝子の探索, 日本小児歯科学会第 30 回九州地方会大会および総会, 長崎市, 2012. 10. 27.

(4) 齊藤一誠: 口腔組織からの iPS 細胞の作製とその歯科領域への利用 (小児歯科の観点から), 第 54 回歯科基礎医学会 サテライトシンポジウム, 郡山市, 2012. 9. 14.

(5) 佐藤正宏, 赤坂恵理, 齊藤一誠, 大塚正人, 渡部聡: プラスミド DNA の卵管内注入、続く生体電気穿孔によるマウス着床前胚への遺伝子導入法の開発, 第 59 回日本実験動物学会総会/第 46 回日本実験動物技術者協会総会・合同開催, 大分 (別府国際コンベンションセンター), 2012 5. 24-5. 26.

(6) 野口洋文, 齊藤一誠, 片岡仁美, 渡部昌実, 藤原俊義: マウス誘導膵幹細胞 (Induced Pancreatic Stem (iPaS) Cells) の樹立, 第 112 回日本外科学会定期学術集会シンポジウム (2) 外科領域における先端技術・治療の開発, 東京都, 2012. 4. 12.

(7) 野口洋文, 齊藤一誠, 片岡仁美, 渡部昌実, 藤原俊義: マウス膵幹細胞の培養条件の検討, 第 38 回日本臓器保存生物医学会学術集会, 仙台市, 2011. 11. 25-26.

(8) 野口洋文, 齊藤一誠, 片岡仁美, 渡部昌実, 藤原俊義: マウス膵幹細胞の樹立効率の検討, 第 38 回日本臓器保存生物医学会学術集会, 仙台市, 2011. 11. 25-26.

[図書] (計 2 件)

(1) 齊藤一誠：小児歯科はいま、成育医療へ（編者 吉田昊哲, 嘉ノ海龍三, 山崎要一），3. 成長・発育 ① 先天性歯により哺乳困難なときの対応 ⑤ 骨性癒着による低位乳臼歯と後継永久歯の萌出, 2011年デンタルダイヤモンド東京, pp. 78, 82, 2011. (総ページ数：157頁).

(2) 山崎要一, 岩崎智憲, 齊藤一誠：小児歯科学 第4版（編者 高木裕三, 田村康夫, 井上美津子, 白川哲夫），第1編 小児歯科学概論, 7章 歯列および咬合の発育と異常, 医歯薬出版, 東京, pp. 84-100, 2011. (総ページ数：427頁).

[その他]

ホームページ等

新潟大学 小児歯科学分野

<http://www.pediatric-dent.net/pedo.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 一誠 (SAITOH ISSEI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90404540

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし