

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462971

研究課題名(和文) iPS細胞の供給源としての乳歯歯髄細胞の有用性について

研究課題名(英文) Application of deciduous teeth pulp cell as supply source for induced pluripotent stem (iPS) cells

研究代表者

釜崎 陽子 (KAMASAKI, Yoko)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：30253678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：健康または何らかの全身疾患罹患の20名の小児の交換期障害の乳歯27歯より歯髄細胞を採取した。そのうち培養、継代、ストックに成功したものは8であった。細胞間で増殖能率に大きな差が認められた。

全ての細胞は、多能性幹細胞のマーカー蛋白(Oct3/4, Nanog, Sox2含む15種)を発現していた。歯種および継代を重ねることにより、細胞形態または多能性幹細胞のマーカー蛋白の発現には有意差を生じなかった。細胞のリプログラミングを行う方法としてのGSK-3阻害剤(BIO)の応用について、低濃度(1 μ M)の応用により、細胞増殖能が抑制され、多能性幹細胞のマーカー蛋白のうちSnailの発現亢進を認めた。

研究成果の概要(英文)：The 27 dental pulp cells were isolated from human exfoliated deciduous teeth of 20 children, who were healthy or had some kind of systemic disease. Only 8 dental pulp cells from deciduous teeth were able to be cultivated continuously and cryopreserved. The proliferative potential of these cells were varied widely.

All of these cells expressed 15 kinds of protein markers for the human pluripotent stem cell including Oct3/4, Nanog, Sox2, and so on. The kind of tooth and passage culture did not effect on the expression of all protein markers for the human pluripotent stem cell significantly. As the method for reprogramming of cells, application of Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors (BIO) with low concentration (1 μ M) suppressed cell proliferation potential and increased expression level of Snail in 15 kinds of protein markers for the human pluripotent stem cell.

研究分野：小児歯科学

キーワード：乳歯由来歯髄細胞 iPS細胞 多能性幹細胞 GSK-3阻害剤(BIO)

1. 研究開始当初の背景

再生医療における人工誘導多能性細胞 (iPS 細胞) の実用化への期待

iPS 細胞は、線維芽細胞のように最終分化した細胞、あるいは幹細胞、前駆細胞に *Oct3/4*, *Nanog*, *Sox-2*, *c-Myc*, *Klf-4* などの特定の転写因子を過剰発現させ、リプログラミングを行うことによって作り出される。この発見は、世界的な評価を受け、山中教授のノーベル賞受賞という形で結実し、さらに世界中で盛んに研究が行われている。

再生医療の場面において、iPS 細胞から分化誘導された肝細胞、網膜細胞などの実用化への期待が高まっていた。

ヒト永久歯歯髄細胞の iPS 細胞のソースとしての有用性

ヒト歯髄細胞中には、神経細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞、脂肪細胞などのさまざまな細胞集団に分化可能な幹細胞が存在していることから、再生医療への有用性が多く報告されていた。2010 年、ヒト永久歯歯髄細胞から iPS 細胞への誘導が報告され、ヒト永久歯歯髄細胞の iPS 細胞のソースとしての有用性が明らかとなった (J Den Res 89(8):773-778, 2010)。

ヒト乳歯歯髄細胞の iPS 細胞のソースとしての有用性

乳歯由来歯髄細胞は、永久歯由来歯髄細胞とは生理的歯根吸収を生じる点で機能的に異なっている。乳歯由来歯髄細胞の方が、OCT-4, NANOG, SOX2, REX-1 などの多分化能に関連する遺伝子や FGF, TGF β などの成長因子が高発現していることや継代を繰り返すことによる脱分化が少ないことにより、iPS 細胞のソースとして有用であることが示唆された (J Endod 35, 1536, 2009. J Endod 36, 1504, 2011.)。

脱落乳歯歯髄を用いた十分な再生医療研究のために日本小児歯科学会としても、平成 20 年から「乳歯を用いた再生医療技術開発」を学会ですすめる重点研究領域として、全国の大学歯学部および歯科大学を対象に歯髄細胞培養のための技術トレーニングを実施した。これにより我々の研究施設においても乳歯から歯髄細胞を採取、培養を行う環境を整えることができていた。

外科的な侵襲を伴わず細胞を採取できるヒト脱落乳歯には、大きなメリットがあると考えられたが、歯髄細胞中に存在する多分化能を有する歯髄幹細胞は、歯髄細胞中の 0.2~1% と極めて少ないとされている上に、脱落乳歯から採取できる歯髄組織は、第三大臼歯や過剰歯などから採取される永久歯歯髄組織に比べ、極めて少量である。そのため、脱落乳歯歯髄を用いた十分な再生医療研究を行い、実用化をすすめるためには、

乳歯歯髄細胞を大量にストックしておく必要があると考えられた。

乳歯は、平均的に 5 歳から 12 歳までの期間中に 5 種 20 歯が順次脱落する。全てが一様ではないことも想定され、これらの情報はできるだけ多く収集しておく必要があると思われた。

一方で、細胞のリプログラミングを行う別の方法として、東北大学の福本教授の研究グループでは当時、GSK-3 阻害剤 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) の応用に取り組んでおられ、我々は、この応用方法についての技術指導を受け、マウス歯髄細胞をもちいて予備実験を行っていた。マウス歯髄細胞の、特定の転写因子を用いない方法による細胞のリプログラミングが可能になりつつあり、今後はヒト歯髄から歯髄細胞を採取して、リプログラミングを行い、別の細胞に分化誘導していくことが可能になると考えられた。

受精卵を用いる胎生幹細胞 (ES 細胞) が抱えていた倫理的問題を解決できる iPS 細胞の報告により再生医療研究は急速な進展をみせ、実用化にむけて各分野で研究が盛んである。十分な再生医療研究が行われるためにも iPS 細胞のソースがふんだんに必要であると考えられた。皮膚の細胞の場合は、紫外線による影響や加齢による遺伝子変異を生じている確率が高まる上に、少量にせよ皮膚を採取しなければならない。それに対し、乳歯の歯髄細胞は、経年的な遺伝子変異を生じている可能性は成人に比較すると低いと考えられ、生理現象として脱落し、廃棄される乳歯から採取されるものである。この組織が、iPS 細胞のソースとなりうることが証明されれば、倫理的、免疫学的問題を回避でき、安全かつ経済的に安価な再生医学研究の資源となりうると思われた。

さらに、BIO を応用することによる、特定の転写因子を用いない方法により細胞のリプログラミングが実証されたならば、遺伝子導入などの複雑な工程を経ないためより安価な手法の確立となりうる。

2. 研究の目的

生理現象の一環として安全に採取できる脱落乳歯の歯髄由来細胞の人工誘導多能性細胞 (iPS 細胞) 化を目的に、これを安定的に培養、増殖させ、その性質を精査しデータ化する。

3. 研究の方法

脱落乳歯の歯髄組織採取培養

歯髄を採取した乳歯については、歯種、脱落した年齢、う蝕の有無と程度について記録する。また、歯髄細胞の培養の成否と増殖に要した期間を記録する。

継代を行い、各継代の細胞のストックを作成する。継代による性質の変化、菌種やう蝕の有無による増殖能や多分化能のマーカー蛋白の発現の有無などを調べる。

4. 研究成果

脱落乳歯の採取と培養

20名の小児（5歳11ヶ月～23歳1ヶ月、健常児12名、何らかの全身疾患（急性リンパ性白血病、全前脳胞症、21トリソミー、伊藤白斑、若年性皮膚筋炎）を有している者8名）の交換期障害の乳歯27歯（乳前歯13歯、乳臼歯13歯）及び抜歯を必要とした埋伏過剰歯1より本人と保護者の同意のもと、歯髄細胞を採取した。

そのうち培養、増殖、ストックに成功したものは、8（内訳は、乳前歯4、乳臼歯4）であった。

交換期乳歯であり、採取した組織は極めて少量であったため、10cmの細胞培養ディッシュ上でコンフルエントになるまで増殖させるのに約1ヶ月～3ヶ月を要した。培養に失敗したものは19（内訳 付着しなかったもの5、付着後増殖培養の過程における明らかなミスによるもの4、付着後増殖しなかったもの5、増殖後付着細胞が剥離したものの5）であった。

脱落乳歯歯髄細胞のストックの作成：コンフルエントまで増殖させた8種の歯髄細胞のうち、5種類について各3ずつ10代まで継代し、ストックを作成した。継代中の増殖のペースは概ね良好であったが、増殖能率には細胞間で差が認められた。5日～4週間毎に継代をおこなった

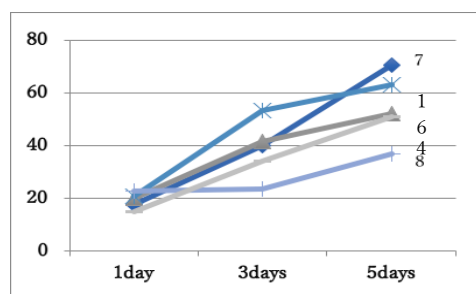
	菌種	採取時年齢	う蝕	基礎疾患	初代細胞の培養期間	継代間隔
1	下A	6y9m	無	無	38日	6～7日
2	下D	9y5m	無	無	60日	
3	上C	10Y1M	C1	ALL	35日	
4	上A	6y9m	無	無	42日	2～3週
5	上E	10Y7M	無	全前脳胞症	80日	
6	上E	11y3m	C2	無	100日	10～8日
7	上D	10Y2M	C2	無	70日	10～7日
8	上A	7Y2M	無	無	60日	4～3週

線維芽細胞様、上皮細胞様、両者の混合の細胞形態が認められた。増殖効率の悪かった4と8では形態がやや大きいように思われた。

培養、継代を行っていく中で、細胞間での増殖のスピードに違いが認められたため、

増殖試験を行った。

図1：増殖能



細胞間で増殖能率に差異が認められた。最も増殖のスピードが早かったのは、乳臼歯由来で、初代培養には約70日を要したが、継代中は増殖が早く、7～10日毎で継代が行われていた。

同程度の増殖スピードが認められていたのは、乳前歯由来であり、これは初代培養も順調で38日を要し、継代中も増殖は早く、6～7日毎で継代が行われていた。

最も増殖のスピードが遅かったのは、乳前歯由来であり、初代培養細胞に約55日を要し、継代中増殖が遅く、3～4週毎で継代が行われた。

乳歯歯髄由来細胞のiPS細胞の供給源としての有用性について

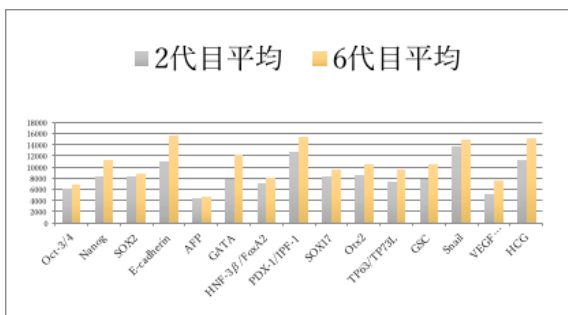
(1) 継代および菌種による差

ストックされた細胞の中から、乳前歯2種および乳臼歯2種の各2代目と6代目の細胞について比較を行った。

乳前歯2種、乳臼歯2種の細胞の2代目と6代目の細胞の形態にはほとんど違いを生じていなかった。

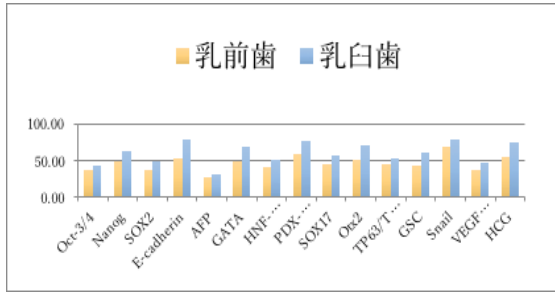
次に、計8よりタンパク質を抽出し、多能性幹細胞のマーカー15種（Oct-3/4, Nanog, SOX2, E-Cadherin, α -Fetoprotein (AFP), GATA-4, HNF-3 β /FoxA2, PDX-1/IPF1, SOX17, Otx2, TP63/TP73L, Goosecoid (GSC), Snail, VEGF R2/KDR/F1k-1, HCG) の発現を解析した。

図2：多能性細胞マーカー蛋白の発現 継代による影響



結果、4種の細胞からはいずれも15種類全てのマーカー抗体を検出された。全てのマーカーについて6代継代群のほうで高い発現を示してしていたが、有意差は認められなかった。

図3：多能性細胞マーカー蛋白の発現
菌種による影響



同様に菌種による差（乳前菌と乳白菌）も有意ではなかった。

(2) GSK-3 阻害剤の影響

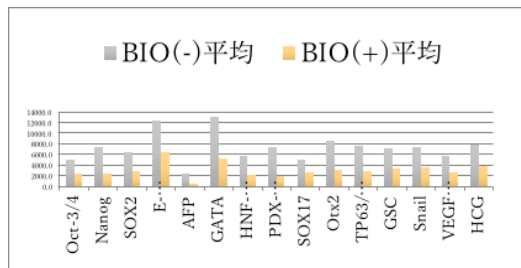
ストックされた細胞の中から、乳前菌2種および乳白菌2種の計4種の細胞を用いた（各々について5代目を使用）。それぞれの細胞について GSK-3 阻害剤 (BIO) の影響を調べた。

マウス歯髄細胞を用いた予備実験では 3~5 μM BIO を用いていたことから、まず、5 μM MBIO 添加、48 時間培養の影響を調べたが、この場合、死細胞が出現することがあったため、3 μM 濃度で添加し、その影響を調べた。

3 μM BIO を添加し、48 時間培養することにより、一個一個の細胞は、やや拡大しており、突起をもつ形態が単純化しているように見える。また、増殖抑制効果が明らかであった。元々増殖スピードが遅い傾向を示していた細胞4では、影響が少ないように思われた。

次に、これらの8個の細胞よりタンパク質を抽出し、多能性幹細胞のマーカー15種（Oct-3/4, Nanog, SOX2, E-Cadherin, α-Fetoprotein(AFP), GATA-4, HNF-3 β/FoxA2, PDX-1/IPF1, SOX17, Otx2, TP63/TP73L, Goosecoid(GSC), Snail, VEGF R2/KDR/Flk-1, HCG) の発現を解析した。

図4：多能性細胞マーカー蛋白の発現
3 μM BIO の影響

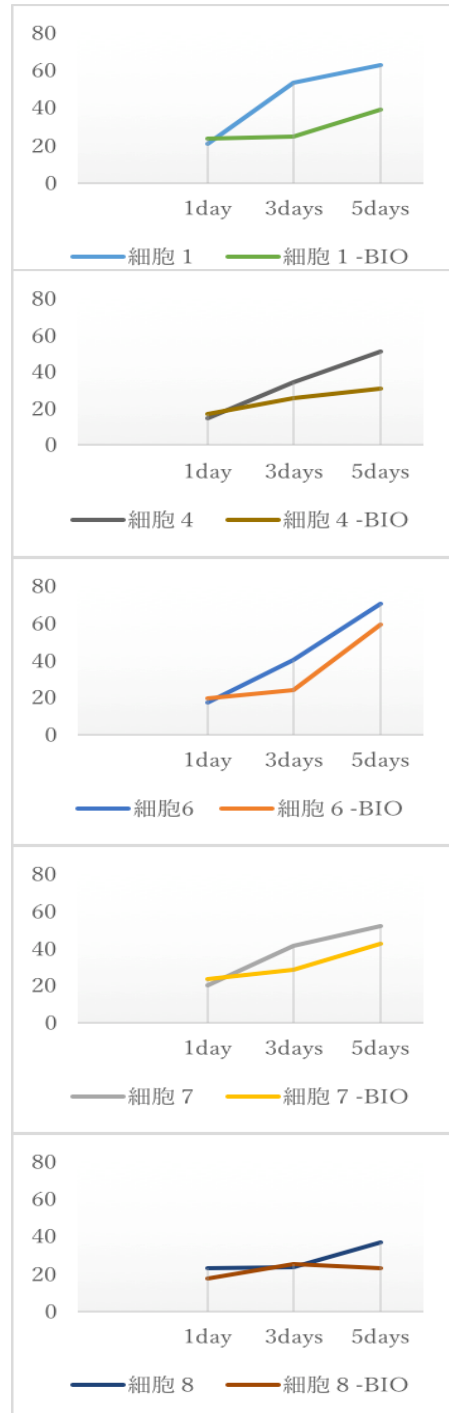


結果は、グラフのとおりであり、3 μM BIO を添加して 48 時間培養した細胞で、多能性幹細胞のマーカータンパクの発現は、15 種全てで減少を認めていた。

3 μM BIO を 48 時間作用させることによる影響は、細胞増殖の顕著な抑制および多能性幹細胞マーカータンパクの発現減少という形で現れたことから、次に、低濃度 BIO (1 μM)

により同じ実験を行った。増殖抑制の効果は認められたが、3 μM BIO 添加に比べて、顕著ではなかった。形態は、より細長く突起を伸ばし紡錘形が顕著に認められた。

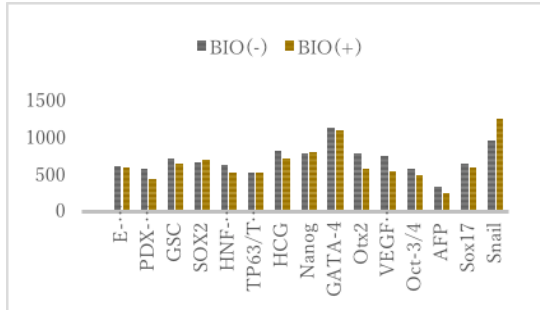
1 μM BIO 添加後 5 日間の増殖試験を行った。
図5：BIO (1 μM) による影響 増殖試験



1 μM BIO の添加によって、増殖は軽度に抑制されていた。抑制の程度は、細胞間で異なっていた。増殖能が強く抑制されていたのは、元々増殖能率のよい細胞1で、一方、増殖能の低い細胞8では、増殖抑制効果は明らかではなかった。

次に、細胞1、6、7、8の細胞について、

1 μ M BIO の添加後 48 時間後にタンパク質を抽出し、多能性幹細胞のマーカー 15 種 (Oct-3/4, Nanog, SOX2, E-Cadherin, α -Fetoprotein(AFP), GATA-4, HNF-3 β /FoxA2, PDX-1/IPF1, SOX17, Otx2, TP63/TP73L, Goosecoid(GSC), Snail, VEGF R2/KDR/F1k-1, HCG) の発現を解析した。
 図 6 : 多能性細胞マーカー蛋白の発現 BIO (1 μ M) による影響



結果は、グラフのとおりであり、1 μ M BIO を添加して 48 時間培養した細胞で、多能性幹細胞のマーカータンパクの発現は、ほとんど変化させなかったが、Snail のみについては発現の上昇を示していた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

釜崎 陽子 (KAMASAKI, Yoko)
 長崎大学・病院 (歯学系)・講師
 研究者番号：30253678

(2) 研究分担者

西口 美由季 (NISHIGUCHI, Miyuki)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
 助教

研究者番号：10253676

藤原 卓 (FUJIWARA, Taku)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
 教授

研究者番号：00228975

(3) 連携研究者

福本 敏 (FUKUMOTO, Satoshi)
 東北大学・歯学研究科 (研究院)・教授
 研究者番号：30264253

(4) 研究協力者

なし