

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463000

研究課題名(和文) ヒト歯髄細胞におけるiPS細胞誘導効率の促進因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of promoter of iPS cell induced efficiency in 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄細胞の異なる株間において、iPS細胞を誘導する効率に関与する因子として、DLX4の関与を明らかとしてきたが、この因子の発現の異なる細胞間におけるDNAマイクロアレイの結果、ある特定の因子が候補として挙がってきた。また、DLX4の発現は、歯髄細胞をTGF-betaで処理することでDLX4の発現を抑えることができることを見出しているが、この細胞内情報伝達系を検討した結果、ERK、p38MAPK、Aktなどの活性化を認めた。そこで、これらの経路におけるDNAマイクロアレイで特定された因子発現の関与を検討したところ、Aktの経路の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although the involvement of DLX4 has been clarified as a factor involved in the efficiency of inducing iPS cells among different dental pulp cell lines, as a result of DNA microarray between different cell lines expressing this factor, one factor is cited. We also found that the expression of DLX4 can suppress the expression of DLX4 by treating dental pulp cells with TGF-beta, but as a result of investigating this intracellular signaling system, ERK, p38 MAPK, Akt activation was confirmed. Therefore, when investigating the involvement of the factor expression specified in the DNA microarray in these pathways, the involvement of the Akt pathway was suggested.

研究分野：口腔外科

キーワード：歯髄細胞

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、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すことに着目し、2005 年から抜去智歯よりヒト智歯由来幹細胞 (DPSC) 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、歯髄以外にも、歯肉や顎骨骨膜といった歯周組織の採取・培養も開始している。

DPC はヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) と比べて高効率・短期間での iPS 細胞誘導が可能で、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有望なリソース細胞であることも示されてきている。細胞の初期化は未熟な細胞 (ステムネス性の高い細胞) ほど容易とされているが、DPSC のステムネス性も継代培養により喪失するため、「ヒト智歯由来組織幹細胞のステムネス性と iPS 細胞誘導効率の検証」(2009 - 10 年度、挑戦的萌芽研究) の支援を受けて、智歯由来 DPSC は、低酸素 (3%)、低密度で培養することでコロニー形成能・増殖能が増強することを明らかとした。この結果は、採取した DPSC を良質に維持するのみならず、今まで樹立困難であった高齢者からの DPSC の樹立効率を向上させた。

一方、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、実際には、DPC からの iPS 細胞誘導効率には個体差があり、基本的に高い誘導効率を示すものの一部の細胞株では HDF と同等の誘導効

率にとどまっていることに加え、iPS 細胞が誘導に由来する元の細胞の情報を DNA メチル化という形で epigenetic に記憶しているということも報告されている。さらに、「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」(2011-2013 年度、基盤研究・C) の支援を受けて、DNA アレイを用いて遺伝子発現を検証した結果、28 個の遺伝子がピックアップされ、これまでのところ、このうちの DLX4 の導入が、ヒト DPSC からの iPS 細胞の誘導効率を上げることが示された (Fig.4)。c-MYC の使用を回避することで、発がんリスクを下げることに貢献する。また、DLX4 の導入で iPS 細胞を誘導する際に、iPS 細胞化するコロニー形成率が高く、未熟な iPS 細胞化しないコロニー形成率が低いことも示唆される可能性が認められた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト智歯由来歯髄組織幹細胞株を用いて、iPS 細胞化の誘導効率を促進する因子について解析を行うとともに、誘導された各々の iPS 細胞の特性について比較・解析し、より良質な iPS 細胞の誘導を試みる基礎的研究を行い、今後の再生医療に応用可能な医療資源の開拓を目指すことを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、歯髄組織由来の細胞を用い、iPS 細胞誘導における各細胞間・個体間の差異を比較・検討するとともに、誘導効率に大きな差の認められた歯髄組織由来細胞間での genetic/epigenetic な差異を解析していくことで、iPS 細胞化の誘導効率における促進因子の検索を行うとともに、こうして得られた因子の作用機序も検討していく。

これまでに我々が採取・培養してきた智歯由来歯髄細胞を用い、従来のレトロウイルスを

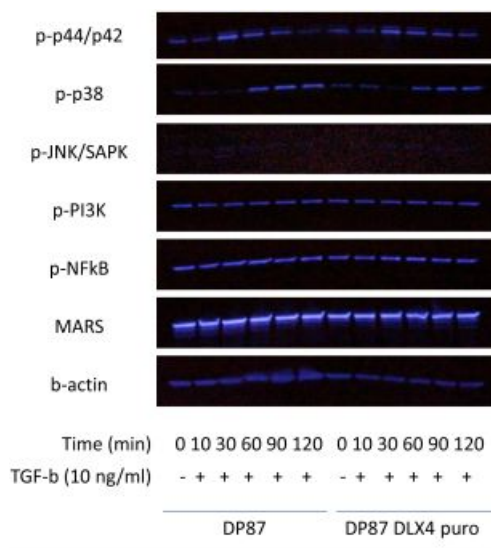
用いた方法で、iPS 細胞を誘導する。その後、iPS 細胞の誘導効率や誘導された iPS 細胞のコロニーの性質に、各細胞間で個体差があるのかどうかを検証するとともに、歯髄由来細胞における genetic/epigenetic な差異を検索する。さらに、歯髄組織由来細胞株の iPS 細胞のコロニー未分化性についての解析をおこない、これらの結果から、より効率よく、良質な iPS 細胞コロニーを得られる方法を検討する。

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、歯髄組織に由来する細胞株を用いて、iPS 細胞の誘導を試み、誘導効率の高い細胞株と低い細胞株に分けて、それぞれの genetic、epigenetic な差異を検討・解析する。genetic、epigenetic な差異の解析は、iPS 細胞への誘導効率が高い細胞と低い細胞での細胞株を用いて、DNA マイクロアレイで網羅的に発現遺伝子の差異を検討する。また、これまでに樹立した歯髄組織由来の細胞株から誘導した iPS 細胞化の誘導効率促進因子 (DLX4 など) における細胞内シグナル伝達および発現タンパク・サイトカインについて、iPS 細胞誘導因子の導入の差異によって、各細胞間の細胞内情報伝達におけるシグナル因子の活性化を Western Blot 法を用いて解析する。

4 . 研究成果

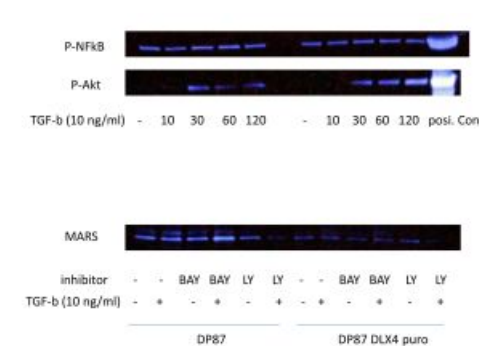
歯髄細胞株から iPS 細胞を誘導する際に、DLX4 高発現の細胞株は高率で iPS 細胞を誘導することが可能であることをこれまでの研究で明らかにしてきたが、この DLX4 高発現の歯髄細胞株と低発現の歯髄細胞株とで、DNA マイクロアレイを行い、MARS の遺伝

子発現に差がある可能性が示唆された。また、DLX4 の発現は、歯髄細胞を Transforming Growth Factor (TGF)-beta で処理することで発現が抑えられることを見出しており、この機序を解明するために、TGF-beta で歯髄細胞を処理して、細胞内の情報伝達経路の活性化をイムノプロット法にて検討を行った。その結果、Mitogen activated protein kinase (MAPK) スーパーファミリーやその他の細胞内情報伝達系の活性化が引き起こされていることが示されたが、この活性化は DLX4 の発現の高低では有意な差は認められなかった (Fig.1)



(Fig.1)

しかし、このうちの NF- k B pathway や Akt pathway においては、MARS の発現に影響を及ぼす可能性が示唆された (Fig.2)



(Fig.2)

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

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

研究分担者

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

研究分担者

玉置 也剛 (TAMAOKI, Naritaka)
岐阜大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40585303

研究分担者

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

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()