

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670883

研究課題名(和文)xeno-freeヒトiPS細胞樹立のための高機能歯髄由来feeder細胞の開発

研究課題名(英文)Development of xeno-free human feeder cell with multi-function derived from the dental pulp cell

研究代表者

齊藤 一誠 (Issei, Saitoh)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90404540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞では、その樹立時にfeeder細胞を必要とする。iPS細胞の臨床応用を考えた場合、マウス由来feeder細胞の混入のないxeno-freeな環境下でのiPS細胞の樹立は非常に重要である。

本研究では、新たな機能を付加したヒト組換えfeeder細胞を開発し、ヒトiPS細胞の培養維持や樹立に有効であるかどうかを検討した。樹立細胞についてfeeder細胞として乳歯歯髄細胞から樹立したiPS細胞の培養維持が可能であったが、このfeeder細胞上でのiPS細胞の樹立は困難であった。初代培養細胞の継代数や培養条件などの乳歯歯髄細胞の品質による影響が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Feeder cell was necessary for the establishment of iPS cell. When we consider the clinical applicability of human iPS cell, we must use xeno-free feeder cell without mixture of a mouse origin cell.

The aim of this study was the development of xeno-free human feeder cell with multi-function derived from the dental pulp cell. The maintenance of the iPS cell established from human deciduous dental pulp cells (HDDPCs) was possible as the feeder cell, but it was difficult to establish iPS cell from HDDPCs using the feeder cell. It was considered that the number of passages of the primary cell and the influence by the quality of HDDPCs of the cultivate condition.

研究分野：小児歯科学

キーワード：再生歯学 乳歯歯髄細胞 iPS細胞 feeder細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年の再生医療技術の進歩は目覚ましく、歯科領域でも歯肉、智歯や乳歯に由来する iPS 細胞が続々単離され、これらを用いた歯、骨や神経の再生の可能性が論じられている。iPS 細胞の臨床応用を考えた場合、マウス由来 feeder 細胞を用いない、いわゆる xeno-free な環境下での iPS 細胞の樹立、その分化誘導が望まれる。実際、ヒト細胞を feeder として用いた先駆的研究<sup>1)</sup>は既に報告されたが、いくつかの問題点が生じた。例えば、細胞分裂を抑制する薬剤 mitomycin C で feeder 細胞を処理するとその細胞増殖は止まるが、培養基質から剥がれやすいことや feeder 細胞のロット差が大きいことなどの問題がある。

そこで、feeder 細胞に有用な機能を組み込むことにより「feeder としての機能強化を図る」試みが行なわれてきた。例えば、ES 細胞/iPS 細胞の未分化状態を維持するために leukemia inhibitory factor (LIF) 遺伝子を導入された feeder の作成 (SNL)、細胞間接着分子である E-cadherin の導入、feeder-less の環境で iPS 細胞形成を誘導する bone morphogenetic protein 4 (BMP4)、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、activin A 遺伝子の導入などである。一方、様々な成長因子を含む培地で培養する方法や matrigel 上で細胞を維持する方法により、iPS 細胞を feeder-less の環境で樹立・培養する試みもなされている。しかし、これらはコスト面で非常に難がある。また、技術的にもまだ標準的なプロトコールはなく、従って、研究者間では iPS 細胞樹立・維持のためには未だ feeder 細胞のニーズが高い。そこで、様々な成長因子を分泌でき、matrigel の代わりに細胞-基質・細胞-細胞間接着を促進させる高機能付加ヒト feeder 細胞を遺伝子工学的に作製することを考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、新たな機能を付加したヒト組換え feeder 細胞を開発し、ヒト iPS 細胞の培養維持や樹立に有効であるかどうかを目的とした。

## 3. 研究の方法

iPS 細胞樹立用の高機能付加 feeder 細胞作製のために、薬剤耐性遺伝子、蛍光遺伝子、成長因子、細胞間接着因子などを盛り込んだプラスミドベクターを構築した。具体的には、まず、トランスポゾン系ベクター (2 種類) を作製した (図 1)。

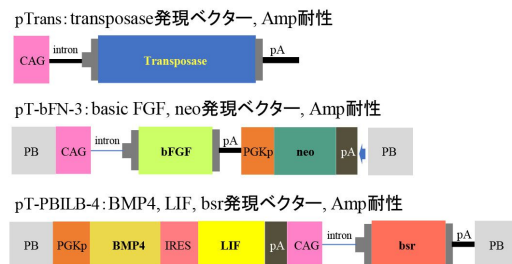


図1：構築ベクター

それぞれには、鶏β-actin ベースのプロモーターであるCAGもしくはPGKプロモーターの下流に目的遺伝子であるFGF2 (成長因子) および BMP4 (成長因子) (すべてヒト由来) に対応するcDNAを設置した。さらにBMP4の下流にIRESを配置し、IRESの下流には、LIF (iPS細胞の未分化状態を維持させるタンパク) を配置した。目的遺伝子の下流には薬剤耐性マーカー遺伝子 (neo, puro, hph, bsr など) が置かれる。IRESは一つのmRNAから2種類のタンパクの合成を許す配列である。構築ベクターを乳歯歯髄細胞に遺伝子導入し、高機能付加ヒト feeder 細胞を作製し、ヒト乳歯歯髄細胞から iPS 細胞が効率よく樹立されるかを検討した。

## 4. 研究成果

まず、成長因子などのサイトカイン FGF2、BMP4 および LIF を分泌するヒト組換え feeder 細胞を樹立した。遺伝子導入を効率よく行うために、今回は piggyBac トランスポゾン系のプラスミドを用いた。トランスポゾンによる遺伝子導入法は、哺乳類細胞でも効率よく外来性の遺伝子導入を達成でき、当該遺伝子が宿主ゲノムに挿入された遺伝子導入安定株を通常の系よ

りも効率よく導入できる。電気穿孔法 (Invitrogen, Neon system)にて遺伝子導入を行い、2日後にEGFPタンパクの発現を確認し、6割程度の導入効率を得ることが分かった(図2)。

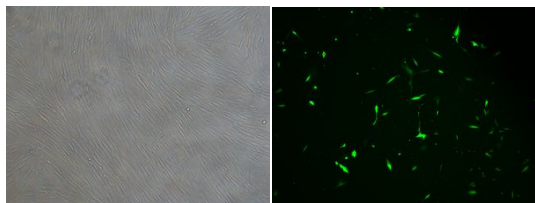


図2：歯髄初代培養細胞(左図)と遺伝子導入株

さらに、ヒトiPS細胞の培養維持や樹立に有効であるかどうかを検討した。樹立細胞について feeder細胞として乳歯歯髄細胞から樹立したiPS細胞の培養維持が可能であった(図3)が、このfeeder細胞上でのiPS細胞の樹立は困難であった。初代培養細胞の継代数や培養条件などの乳歯歯髄細胞の品質による影響が考えられた。

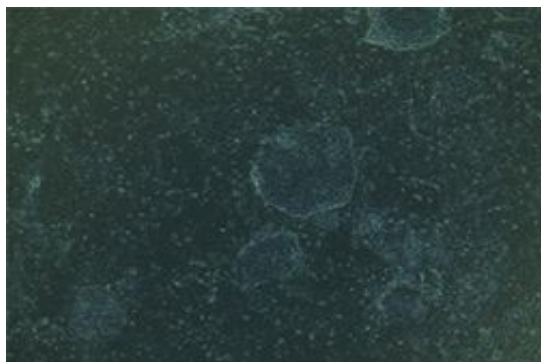


図3：樹立feeder細胞上でのヒトiPS細胞の培養維持

## 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)

Masahiro Sato, Emi Inada, Issei Saitoh, Yuko Matsumoto, Masato Ohtsuka, Hiromi Miura, Shingo Nakamura, Takayuki Sakurai, Satoshi Watanabe: A combination of targeted toxin technology and the

piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 10(1); 143-153, 2015. (査読あり)

Masahiro Sato, Emi Inada, Issei Saitoh, Yuko Matsumoto, Masato Ohtsuka, Hiromi Miura, Shingo Nakamura, Takayuki Sakurai, and Satoshi Watanabe: A combination of targeted toxin technology and the piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 10(1); 143-153, 2015. (査読あり)

Masahiro Sato, Issei Saitoh, Emi Inada: Efficient CRISPR/Cas9-based gene correction in induced pluripotent stem cells established from fibroblasts of patients with sickle cell disease. *Stem Cell Investigation*. 3; 78, 2016. doi: 10.21037/sci.2016.11.05 (査読あり)

Tomoya Murakami, Issei Saitoh, Masahiro Sato, Emi Inada, Miki Soda, Masataka Oda, Hisanori Doman, Yoko Iwase, Tadashi Sawami, Kazunari Matsueda, Yutaka Terao, Hayato Ohshima, Hirofumi Noguchi, Haruaki Hayasaki: Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1 promoter-driven selection markers. *Archives of Oral Biology*, 81(1-2); 110-120, 2017. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.033. (査読あり)

[学会発表](計5件)

稲田絵美, 齊藤一誠, 窪田直子, 松本裕子, 村上智哉, 澤味規, 山崎要一: piggyBac トランスポゾンによるヒト乳歯歯髄細胞か

らの遺伝子導入安定株の効率的取得, 第 52 回日本小児歯科学会大会, 東京都・きゅりあん, 2014.5.16-17. (査読なし)

稲田絵美, 佐藤正宏, 齊藤一誠, 窪田直子, 澤味 規, 村上智哉, 左右田美樹, 早崎治明, 山崎要一: ヒト乳歯歯髄細胞のアルカリホスファターゼ活性と OCT-3/4 発現は iPS 細胞樹立の可否を予測する有効なマーカーである, 第 53 回日本小児歯科学会大会, 広島市・広島国際会議場, 2015.5.21-22. (査読なし)

Miki Soda, Issei Saitoh, Emi Inada, Tomoya Murakami, Yoko Iwase, Naoko Kubota, Tadashi Sawami, Yuko Matsumoto, Youichi Yamasaki, Haruaki Hayasaki, Hayato Ohshima, Masahiro Sato. piggyBac-transposon-mediated gene-delivery efficiently generates stable transfectants from HDDPCs and HDDPC-derived-iPSCs. IADR/AADR/CADR 93rd General Session and Exhibition, Boston, U.S.A., 2015.3.11-14.(査読あり)

Tomoya Murakami, Issei Saitoh, Masahiro Sato, Emi Inada, Miki Soda, Yoko Iwase, Tadashi Sawami, Ayako Suzuki, Hayato Ohshima, Haruaki hayasaki. The genetic engineering-based isolation of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) positive stem-like cells from human deciduous tooth cell-derived iPSCs. 10<sup>th</sup> Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia in conjunction with 54<sup>th</sup> Annual Conference of the Japanese Society of Pediatric Dentistry, Tokyo, Japan, 2016.5.26-27. (査読あり)

稲田絵美, 齊藤一誠, 窪田直子, 村上智哉, 左右田美樹, 澤味 規, 松枝一成, 早崎治明, 山崎要一: 遺伝子工学的手法による不死化ヒト乳歯歯髄細胞株の樹立と特性解析. 第 55 回日本小児歯科学会大会, 福岡県北九州市, 西日本総合展示

場, 2017.5.25-26. (査読なし)

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/pedo/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

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)  
鹿児島大学・医用ミニブタ先端医療開発センター・教授  
研究者番号: 30287099

稲田 絵美 (INADA, Emi)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号: 30448568

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)  
琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 50378733

松山 清 (MATSUYAMA, Kiyoshi)  
久留米工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授  
研究者番号: 40299540