

論文名：

Repeated transfection of human deciduous teeth-derived dental pulp cells with reprogramming factors enables efficient generation of multipotent intermediate cells that are more susceptible to iPS cell formation

(脱落乳歯由来歯髄細胞への初期化因子の繰り返し遺伝子導入は、iPS細胞樹立途中の多能性中間細胞の効率的な樹立を可能にする)

(要約)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 斎藤 美樹

【目的】近年、iPS細胞作製技術を応用しヒト組織特異的幹細胞の樹立が可能となり、それらは再生医療の細胞供給源として有用とされ盛んに研究が行われている。我々は実際、マウス臍幹細胞、肝幹細胞などの樹立に成功している。これらの細胞は、1) 樹立効率がiPS細胞よりも高い、2) 分化誘導効率がES/iPS細胞より高い、3) ES/iPS細胞で懸念される未分化細胞残存による腫瘍(奇形腫)形成の可能性が低い、などの特徴を持ち、ES/iPS細胞の臨床応用に関わる問題点の多くを解決する可能性を秘める。我々はヒト組織特異的幹細胞が、分化細胞への初期化因子の一過性過剰発現によって部分的にリプログラミングされiPS細胞への移行の直前の状態であると仮説し、iPS細胞作製技術を応用し、ヒト乳歯歯髄細胞に対して初期化因子の遺伝子導入を行った。また、重複遺伝子導入によりもたらされる幹細胞化現象について多角的な検討を行った。

【方法】ヒト乳歯歯髄初代培養細胞にNeon®トランスフェクションシステムを使用し、初期化因子を遺伝子導入しiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞に対して代表的な幹細胞特異的マーカーを用いて免疫染色を行い、幹細胞としての特性の有無を確認した。得られたiPS細胞から胚様体を形成し三胚葉への分化を確認した。また、ヒト乳歯歯髄初代培養細胞に初期化因子を遺伝子導入し、3、5、7、9日目後におけるALP活性を組織化学的に調べた。初期化因子の重複遺伝子導入は3回までを行い、同様にALP活性を調べた。細胞の幹細胞化を同定するため細胞からtotal RNAを単離し、cDNA合成後、幹細胞特異的遺伝子群の発現をRT-PCR法にて調べた。単離した細胞を骨系へ分化誘導を行い、Von Kossa染色およびAlizarin染色にて骨系細胞への分化能を評価した。また、神経系へ分化誘導後、Nissl染色にて神経系細胞への分化能を評価した。

【結果】リプログラミングに耐性がある株に対して初期化因子の遺伝子導入を重ねたことで、iPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞においてOCT3/4、SOX2、TRA1-60およびSSEA4のような幹細胞マーカーの発現を免疫染色で確認し、形成した胚様体には三胚葉が含まれることを確認した。また、初期化因子の遺伝子導入3、5、7、9日後のALP活性は経時的に発現が増強し、細胞への遺伝子導入を重ねることで、増殖率の低下およびALP陽性細胞の増加を認めた。RT-PCR解析により、遺伝子導入13日後の細胞は親株と比べて、

【別紙2】

幹細胞マーカーの発現を認め多能性を示した。また、遺伝子導入9日目の細胞を用いて神経細胞や骨細胞への分化誘導を試みた結果、親株よりも優れた多分化能が示された。

【考察】本研究により初期化因子の繰り返しの遺伝子導入により、リプログラミングに対して耐性があるヒト乳歯歯髄初代培養細胞から iPS 細胞を樹立した。このことから複数回遺伝子導入を行うことで、iPS 細胞における分化誘導の際に起きる段階的な分化と逆の事象が引き起こされている可能性があることが示唆された。またリプログラミング過程において、多能性及び非腫瘍原性の組織特異的幹細胞と思われる中間細胞の存在を見出した。このことから、iPS 細胞作製技術は単に iPS 細胞を樹立するだけでなく、組織特異的幹細胞の樹立も可能であることが示された。これらの iPS 細胞および組織特異的幹細胞の樹立技術は、歯科組織の再生における研究の発展に寄与するものと考えられる。