

ファール病 (特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症) からの iPS 細胞樹立と病態解析

研究分担者：柴田 敏之 岐阜大学大学院医学系研究科口腔病態学分野

研究協力者：畠山 大二郎 玉置 也剛

岐阜大学大学院医学系研究科口腔病態学分野

研究要旨

ファール病 (特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症) の病態解析材料を得るために同患者から iPS 細胞の樹立を行った。研究協力の承諾が得られた 6 人の患者の口腔組織 (歯髄、歯肉) から細胞株を樹立した。この内の 1 例の歯髄細胞株 (DP276、歯根形成期) に、山中 4 因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞の作製を試みた。この際、当科が保有している健常者より樹立した歯髄細胞バンク (約 250 株) から本例と同年齢で同じ発育段階の智歯より樹立した細胞株 (DP31、歯根形成期) を対照 (ポジティブコントロール) として iPS 細胞誘導を行った。

最終的にファール病患者由来 DPC 株から iPS 細胞株は樹立できたが、そのコロニー誘導率は DP31 (健常) が 270 個/10mm dish に対し、DP276 (ファール病) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果となった。これまでの解析で、DP31 のような智歯発育段階が未熟である歯冠完成期や歯根形成期より樹立した歯髄細胞株では、通常誘導効率が高いことが分かっており、ファール病の歯髄細胞は細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。この現象は注目に値しファール病の病態解明のみならず現在ほとんど不明となっている細胞初期化機序を解析する糸口になる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

我々は、種々の形成段階にあるヒト抜去歯より歯髄組織細胞 (Dental Pulp Cell: DPC) を既に 250 ライン程樹立・保有し、個体差の検証を行って来ている。その結果、より未熟な形成期の歯から得られる DPC は高い増殖・分化能を持つが、継代培養により喪失することを明らかにして来た (Takeda et al. J Dent Res. 2008) ¹⁾。また、京都大学山中研究室と

共同で、DPC からの iPS 細胞誘導を試み、iPS 細胞を高率にかつ Oct・Sox の 2 因子でも樹立可能であることを見出し、DPC が iPS 細胞の供給源として有用であることを示して来ている (Tamaoki et al. J Dent Res. 2010) ²⁾。更に、DPC はゲノムへのベクター挿入が生じないセンダイウイルス法やエピソームプラスミド法でも容易に iPS 細胞の樹立が可能であることを示して来ている (Nature methods

2011) ³⁾。

そこで、本研究では、我々が保有する種々の年齢・発生段階から得られている豊富なヒト DPC 株を対照として、フェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）患者から DPC 株を樹立し、これらより iPS 細胞株を樹立することで、病態解析（疾患モデル）に資することを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

(1) フェール病患者から細胞株を樹立

通法に従い抜去智歯の歯髄より DPC 株を樹立した (Takeda et al. J Dent Res. 2008) ¹⁾。DPC は、比較的容易に採取・樹立可能であり、培養方法がシンプルであることから、センダイウイルス法やエピソーマルプラスミド法でも高率に iPS 細胞が樹立可能である利点を有している。また、健常者からのバンク化も出来ていることから病態解析に必要な比較対照群を容易に得られることで、DPC をフェール病患者からの iPS 細胞のリソースとして選択した。ただし抜去すべき智歯がない患者は、歯肉から細胞株を樹立した。

(2) iPS 細胞の誘導

iPS 細胞の作製方法には現在の所、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルス、エピソーマルプラスミドなどがあるが、iPS 細胞樹立後の病態解析、特に分子生物学的解析を行う場合にゲノムに影響を残すレトロウイルス法は、その解析を困難にする可能性があると考え、本研究では操作も容易なセンダイウイルス法を選択した。センダイウイルスは negative strand RNA ウイルスで、細胞質にとどまって RNA を転写、複製して蛋白質を合成することから、宿主染色体に影響を与えず、挿入変異や染色体構造変化の危険性もないなどの特徴がある。また siRNA を用いると宿主細胞からセンダイウイルスベクターを容易に除去することが可能である。我々は

山中 4 因子 (Oct4・Sox2・Klf4・c-Myc) を組み込んだセンダイウイルスベクター（産総研・中西先生より分与）を DPC に感染させ、翌日より ES 細胞の培養条件で培養し、その後 ES (iPS) 細胞様コロニーの形成を観察した。1-2 回の植え継ぎを行い、その際に siRNA 処理をすることで、約 2 週間後にヒト ES 細胞様コロニーが出現した。これらのコロニーをピックアップし、iPS 細胞株として樹立した。また抗センダイウイルスベクター抗体による免疫染色で、センダイウイルスベクターが除去されているかどうかを確認した。

(倫理面への配慮)

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症遺伝子バンク登録患者の個人情報には十分配慮し、本研究への承諾と伴に、iPS 細胞樹立およびその後の遺伝子解析に関する説明を行い、承諾の得られた方から細胞株の樹立・iPS 細胞の誘導を行った。

C. 研究結果

本疾患と診断された 6 人の患者より細胞株を樹立した (4 例が歯髄、2 例が歯肉より樹立した)。この内、若く、歯の形成段階も未熟な 16 歳の方の DPC 株 (DP276) を用い iPS 細胞誘導を試みた。これまでの解析から、若年者で歯の形成段階が未熟な智歯由来の DPC では、iPS 細胞への誘導効率が高いことが判っているため、DP276 を用いた。尚、対照としてバンクから同年齢で同様の発育段階由来の DPC 株 (DP31) を選び用いた。その結果、最終的にフェール病患者由来 DPC 株から iPS 細胞株は樹立できたが、そのコロニー誘導率は DP31 (健常) が 270 個/10mm dish に対し、DP276 (フェール病) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果となった。この結果は、フェール病患者由来の DPC 株は細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。

しかし樹立した iPS 細胞株は、ヒト ES 細胞と同程度の増殖能と性質を有することが分かった。また、現在フェール病患者の歯肉由来細胞株からも iPS 細胞の誘導を行っている。

D. 考察

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症患者由来 DPC 株からセンダイウイルスベクターを用いて、non-integration iPS 細胞株を樹立した。この iPS 細胞は、ゲノムに遺伝子変異が無いため今後の分子生物学的解析が容易と考えられた。また、iPS 細胞の誘導過程において樹立効率にこれまで観察されたことのない程著しい違いが見出された。この相違は注目に値すると考えられ、フェール病の病態解明のみならず現在ほとんど不明となっている細胞初期化機序を解析する糸口になる可能性があると考えられた。今後は作製した iPS 細胞を用いて神経誘導等を行いフェール病の病態解析を行うと伴に、今回見出された樹立効率の著しい違いが単に個体差によるものか、疾病に由来するものかを明らかにすることが重要と考えられた。

E. 結論

フェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）患者 6 人から細胞株を樹立した。内 1 例から iPS 細胞を誘導し、今後の病態解析に資する材料を得た。また、この過程において、フェール病患者 DPC 株の iPS 細胞誘導効率は極めて低く、フェール病の病態解析と伴に現在不明となっている細胞初期化機序解明の糸口となる可能性のある現象を見出した。

[参考文献]

- 1) Characterization of stem cell in dental pulp of human wisdom tooth germ. T Takeda, Y Tezuka, M Horiuchi, K Hosono, K Ikeda, D Hatakeyama, S Miyaki, T Kunisada, T Shibata, K Tezuka
J Dental Research 87 (7): 676-681, 2008.
- 2) Dental Pulp Cells for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, Iida K, Kunisada T, Shibata T, Yamanaka S, Tezuka K. J Dent Res 89 773-778 2010
- 3) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. Nature Methods 8(5) 409-412 2011.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（2010/4/1～2011/3/31 発表）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし