

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06048

研究課題名(和文) 遺伝子導入を応用した安全で機能的なiPS細胞由来歯性細胞の新規分化誘導技術の開発

研究課題名(英文) Development of method for generation of iPS cell-derived odontogenic cells by gene transfection

研究代表者

関 大輔 (SEKI, DAISUKE)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：90758442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、iPS細胞由来歯性上皮細胞および間葉細胞の樹立を目的とした。iPS細胞をケラチノサイト分化培地を用いて培養することにより、歯性上皮細胞の前駆細胞となる上皮様細胞を樹立した。また、歯性間葉細胞への分化に必須な因子をiPS細胞由来神経堤細胞に遺伝子導入し、導入遺伝子の発現亢進を確認した。フローサイトメトリーを用いて遺伝子導入されたことを示すGFP陽性細胞の検出を行うことにより、遺伝子導入効率の評価を行った。

研究成果の概要(英文)：We aimed to induce odontogenic cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells) by gene transfection. To induce dental epithelial-like cells, we first generated iPS cell-derived epithelial cells. Next, we transfected essential factor of odontogenesis into iPS cell-derived neural crest like cells. Transfection efficiency was evaluated using flow cytometry.

研究分野：歯学

キーワード：iPS細胞 歯 再生医療

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療の研究が活発に行われている中、歯科領域においても、歯、歯周組織、および顎骨の再生医療の実現に向けて盛んに研究が進められており、歯科の再生医療実現への期待が高まってきている。2009年、申請者らのグループは、世界に先駆けて、器官原基法を応用してマウス歯胚を人為的に作製し、成体マウス口腔内で再生歯が発生・萌出することを明らかにし、歯の再生の実用化に向けた基礎研究を推進してきた。この報告により、「歯の再生」に向けた細胞操作技術の開発は大いに進展したが、再生医療の実現のためには、良質で安全な細胞を十分量準備するための技術開発が必要である。マウス、さらに、ヒトの人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立以来、iPS 細胞を用いた再生医療の実現に向けた研究が活発に行われている。歯科領域では、サイトカインの添加や共培養を行うことで、iPS 細胞は歯性細胞へと分化することが示唆され、iPS 細胞が歯の再生の細胞ソースとなり得ることが示された。しかし臨床応用を考えた場合、これらの方法には、他種細胞の混入、動物由来成分の含有、分化誘導効率、癌化、および細胞の heterogeneity 等の解決すべき問題が残されている。

細胞発生に必須な特異的遺伝子の導入は、iPS 細胞の分化誘導方法として、最も有効な手段の一つである。しかし、遺伝子導入を応用した、iPS 細胞から歯性細胞への分化誘導法は、これまで確立されていなかった。申請者らは、遺伝子導入を応用した iPS 細胞から象牙芽細胞への分化方法の確立を目指し研究を行ってきた。まず、象牙芽細胞の由来となる神経堤細胞を、マウス iPS 細胞から誘導した。その iPS 細胞由来神経堤様細胞に、象牙芽細胞の発生に必須な Pax9 および BMP4 の発現プラスミドを遺伝子導入した結果、象牙芽細胞の前駆細胞である間葉細胞と象牙芽細胞のマーカー発現が亢進し、iPS 細胞由

来歯性間葉および象牙芽細胞の分化が示唆された。これらの成果は、高効率に iPS 細胞から象牙芽細胞を分化誘導できる遺伝子導入技術の確立へとつながる、世界初の知見である。しかし、申請者らの遺伝子導入を応用した iPS 細胞から象牙芽細胞への分化誘導技術には、遺伝子導入効率、分化誘導効率、および細胞の heterogeneity など改善すべき点がある。また、歯の発生には歯性上皮および間葉細胞の相互作用が必要だが、遺伝子導入による iPS 細胞から歯性上皮細胞への誘導は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子導入法を基軸とした、より効率的で安全な iPS 細胞から歯性細胞への新規分化誘導方法の開発を行うこととした。また、分化誘導効率を向上させるために、遺伝子導入された細胞の分取や、iPS 細胞から歯性細胞への分化に必要な導入遺伝子の検索を行うこととした。さらに、樹立した iPS 細胞由来歯性上皮および間葉細胞の歯胚への分化能を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞由来上皮様細胞の樹立

Feeder free で培養した iPS 細胞を BMP4 とレチノイン酸存在下で 2 日間培養した後、ケラチノサイト分化培地を用いて歯性上皮細胞の前駆細胞となる上皮様細胞を誘導した。その後、4% PFA を用いて iPS 細胞由来上皮様細胞を固定し、上皮細胞マーカーとして知られている Cytokeratin8/18 (CK8/18) および Cytokeratin 14 (CK14) の発現を免疫蛍光で解析した。

(2) iPS 細胞から歯性間葉細胞への分化誘導

歯性間葉細胞の前駆細胞である iPS 細胞由来神経堤細胞様細胞に、歯の発生に必須な転写因子である Msx1 を Electroporation により発現させ、2 日間培養した。遺伝子導入された iPS

細胞由来神経堤様細胞からトータル RNA およびタンパク質を精製し、それぞれリアルタイム PCR および Western blot により、導入遺伝子の発現亢進を確認した。

(3) Electroporation による遺伝子導入効率の評価

1.0 × 10⁶ 個の iPS 細胞由来神経堤細胞様細胞に対し、10 μg の GFP 発現プラスミドを導入した。5 日間培養したのちに細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて遺伝子導入された GFP 陽性細胞の検出を行うことにより、遺伝子導入効率の評価を行った。

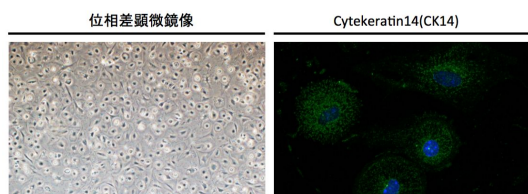
(4) homogenous な GFP 陽性 iPS 細胞由来神経堤細胞様細胞の樹立

遺伝子導入された細胞を特異的に分取するために、ソーティングにより GFP 陽性の iPS 細胞由来神経堤細胞様細胞を選択的に回収した。

4. 研究成果

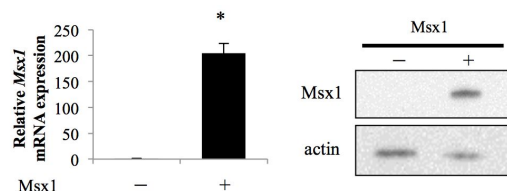
(1) iPS 細胞由来上皮様細胞の樹立

位相差顕微鏡像から、分化誘導された細胞は Keratinocyte の組織像と相似した敷石上の形態を呈していた。分化誘導された細胞では CK8/18、および CK14 の発現が認められた。



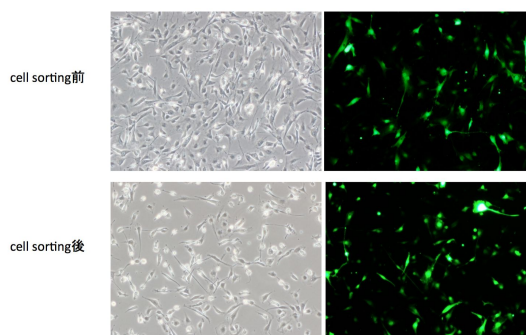
(2) iPS 細胞由来神経堤様細胞における Msx1 の強制発現

Electroporation により、iPS 細胞由来神経堤様細胞において Msx1 mRNA およびタンパク質の発現が促された。



(3) 遺伝子導入により GFP を発現させた iPS 細胞由来神経堤細胞様細胞のセルソーティング

セルソーティングを行うことにより、GFP 陽性の iPS 細胞由来神経堤細胞様細胞を選択的に回収した。細胞総数に対する GFP 陽性細胞の割合は 53-55% であり、我々の論文 (Seki et al., Stem Cells Transl Med, 2015) で示した遺伝子導入効率の結果 (53.0 ± 6.9%) とほぼ一致した。



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1件)

Nobuo Takeshita, Masakazu Hasegawa, Kiyoo Sasaki, Daisuke Seki, Masahiro Seiryu, Shunro Miyashita, Ikuko Takano, Toshihito Oyanagi, Yuki Miyajima, Teruko Takano-Yamamoto. In vivo expression and regulation of genes associated with vascularization during early response of sutures to tensile force. J Bone Miner Metab. 2017, 35 (1): 40-51. doi:10.1007/s00774-016-0737-z., 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

1. 竹下信郎、佐々木紀代、関大輔、清流正弘、宮下俊郎、高野郁子、大柳俊仁、長谷川正和、山本照子、CCN2/CTGF は牽引力が負荷された頭蓋縫合における骨

および血管の形成を制御する、第75回
日本矯正歯科学会大会、徳島、
2016.11.7-9

2. 竹下信郎、関大輔、清流正弘、木村晴地、
高野郁子、大柳俊仁、吉田倫子、長谷川
正和、山本照子、機械的刺激が促す骨形
成過程における前駆骨芽細胞凝集への
CCN2/CTGF の影響、第8回日本CCNフ
ァミリー研究会、岡山、2016.8.27

3. 竹下信郎、佐々木紀代、関大輔、宮下俊
郎、高野郁子、大柳俊仁、山本照子、
CCN2/CTGF は牽引力が負荷された頭
蓋縫合における血管および骨の形成を
制御する、第34回日本骨代謝学会学術
集会、大阪、2016.7.20-23

4. 関大輔、竹下信郎、大柳俊仁、高野郁子、
佐々木周太郎、長谷川正和、山本照子、
遺伝子導入を応用したiPS細胞由来象牙
芽細胞様細胞の新規分化誘導法の開発、
第15回日本再生医療学会総会、大阪、
2016.3.17-19

5. 関大輔、竹下信郎、大柳俊仁、高野郁子、
佐々木周太郎、長谷川正和、山本照子、
遺伝子導入を応用したiPS細胞由来象牙
芽細胞様細胞の新規分化誘導法の開発、
第38回日本分子生物学会大会、神戸、
2016.12.1-4

6. 関大輔、竹下信郎、大柳俊仁、高野郁子、
佐々木周太郎、長谷川正和、山本照子、
遺伝子導入を応用したiPS細胞由来象牙
芽細胞様細胞の新規分化誘導法の開発、
第74回日本矯正歯科学会、博多、
2015.11.18-20

6. 研究組織

(1)研究代表者

関大輔 (SEKI DAISUKE)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90758442

(2)研究協力者

竹下 信郎 (TAKESHITA NOBUO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：50431515

(3)研究協力者

山本 照子 (YAMAMOTO TERUKO)
東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授
研究者番号：00127250