

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05519

研究課題名(和文) トランスポゾン遺伝子発現誘導システムをiPS細胞に応用した歯の再生技術の開発

研究課題名(英文) Development of iPS cell-based tooth regeneration techniques by a transposon-based gene delivery system

研究代表者

江草 宏 (Egusa, Hiroshi)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30379078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた歯の再生技術の創生を目的とし、トランスポゾンを利用したテトラサイクリン制御性遺伝子発現システムに着目した。歯胚発生に重要なBMP-4遺伝子の発現を調節可能なiPS細胞を作製し、その胚葉体から自己組織化を誘導した結果、中胚葉系の細胞を経て軟骨組織が誘導されると共に、歯胚構成細胞と成り得る非神経外胚葉系の細胞に分化を誘導できることが明らかとなった。本研究成果は、BMP-4等の遺伝子発現操作によって、iPS細胞から歯や軟骨の自己組織化を容易にする可能性を示しており、今後の再生医療への貢献が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の歯科治療は、失った歯を人工の補綴装置(入れ歯、ブリッジ、インプラント)を用いて補う術式の上に成り立っているが、万能細胞と称されるiPS細胞の発見によって、歯そのものを再生する技術開発に期待が寄せられている。本研究では、細胞内でゲノム上の位置を転移することのできる塩基配列であるトランスポゾンを用いた遺伝子発現制御技術に着目し、歯の発生に重要な遺伝子の発現を操作可能なiPS細胞を作製することで、iPS細胞を軟骨や歯の源基に成り得る細胞に導けることを明らかにした。本研究成果は、試験管内でiPS細胞から歯や軟骨の作製を容易にする可能性を示しており、今後の再生医療への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop induced pluripotent stem (iPS) cell-based tooth regeneration techniques by a transposon-based tetracycline (tet)-controlled gene regulation system. We focused on BMP-4, an important gene for tooth germ development, and successfully established a tet-controlled BMP-4 gene regulation system for iPS cells in which transcriptional activation of BMP-4 was associated with enhanced mesodermal and non-neuroectodermal lineage commitment. These findings represent an important step toward genetically engineered self-organization of iPS cells, particularly for generation of mesodermal cartilage and non-neuroectodermal organs, such as teeth.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生歯科補綴学 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在の補綴歯科治療は、歯質ならびに歯列の欠損を人工の補綴装置やインプラントを用いて補う術式の上に成り立っているが、万能細胞と称される induced pluripotent stem (iPS) 細胞の発見によって、歯質や歯そのものを再生する次世代技術の開発に期待が寄せられている。また、iPS 細胞は再生医療だけでなく発生学の研究においても重要な役割を果たすことが期待されており、多能性を有する iPS 細胞に遺伝子操作を行うことで、発生過程でその遺伝子がどのような役割を果たすかを解析することも可能である。PiggyBac トランスポゾン遺伝子導入法は、従来のウイルスを用いた遺伝子導入法とは異なり、大容量の遺伝情報を導入可能であり、導入した遺伝子配列を再度人為的に除去することが可能なシステムである。

本研究では、iPS 細胞から歯胚再生を誘導する戦略として、歯胚発生のキーとなる遺伝子の発現を、本来の発生過程で発現している時期を模倣して誘導するアプローチを提案する。これを実現するため、テトラサイクリン (Tet) による発現誘導技術を応用したトランスポゾン遺伝子導入システムを用い、導入遺伝子の発現の On/Off を自在に制御可能な iPS 細胞株を樹立する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯胚発生前に重要な遺伝子の発現が調節可能な iPS 細胞株を作製し、発生過程の模倣による歯胚誘導を試みることによって、iPS 細胞を用いた歯の再生技術の基盤を確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯胚発生前関連遺伝子発現誘導トランスポゾン PiggyBac ベクターの構築

歯の発生前に関連する遺伝子である Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) および Amelogenin の発現誘導トランスポゾン PiggyBac ベクターの構築を行った。目的遺伝子が発現すると GFP (緑色) あるいは mCherry (赤色) を発するように設計された二種類のトランスポゾン PiggyBac ベクターを用い、BMP-4 の cDNA を緑色発色 PiggyBac ベクターに、Amelogenin の cDNA を赤色発色 PiggyBac ベクターに組み込んだ。

各 cDNA を組み込んで構築した PiggyBac ベクターを Transposase 発現ベクターと共に HEK293 細胞に導入した。Tet 制御性-On/Off 発現誘導システムが作動することを、ドキシサイクリン (Tet の誘導体) 存在下における蛍光発色 (緑または赤色) の有無で確認した。

### (2) Tet 制御性に導入遺伝子の発現が誘導可能な iPS 細胞株の樹立

構築した各ベクターをエレクトロポレーション法により歯肉由来マウス iPS 細胞に導入し、薬剤選択クローニングによって適切にベクターが導入された iPS 細胞株の樹立を試みた。樹立した iPS 細胞株における Tet 制御性-On/Off 発現誘導システムの作動を RT-PCR および Western blotting 解析により確認した。

### (3) BMP-4 遺伝子の転写促進が iPS 細胞胚様体の自発的分化に及ぼす影響

作製した BMP-4 導入 iPS 細胞株を用い、浮遊培養によって細胞凝集塊 (胚様体) を形成させ、ドキシサイクリン添加により誘導した導入 BMP-4 遺伝子の転写が胚様体の自発的分化に及ぼす影響を RT-PCR 法により解析した。

BMP-4 の発現制御によって分化が方向付けられた iPS 細胞塊をマウス皮下へ移植し、さらなる成熟組織への分化を組織切片観察により評価した。

### (4) Amelogenin 遺伝子の転写促進が iPS 細胞の歯原性上皮細胞分化に及ぼす影響

Tet 誘導性 Amelogenin 発現制御 iPS 細胞株のエナメル芽細胞誘導過程において、ドキシサイクリン添加により誘導された Amelogenin 遺伝子の転写が、iPS 細胞の歯原性上皮細胞およびエナメル芽細胞への分化に及ぼす影響を RT-PCR 法および von Kossa 染色により検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 特定遺伝子発現誘導トランスポゾン PiggyBac ベクターの構築

BMP-4 あるいは Amelogenin の cDNA を組み込んだ PiggyBac ベクターを HEK293 細胞に導入した結果、ドキシサイクリン添加によって各導入遺伝子およびそのタンパク質の発現が誘導されたことから、構築した遺伝子発現制御ベクターが予想通り作動することが確認された。

### (2) Tet 制御性特定遺伝子発現誘導 iPS 細胞株の樹立

構築した各 PiggyBac ベクターを遺伝子導入して得た各 iPS 細胞株にドキシサイクリンを添加した結果、0.02~2 µg/ml の添加濃度で各導入遺伝子およびそのタンパク質の発現が著明に誘導された。また、作製した iPS 細胞株は未分化幹細胞マーカーである Nanog, Oct3/4 および SSEA-1 を発現しており、多能性幹細胞としての性質を維持していたことから、Tet 制御性に BMP-4 あるいは Amelogenin の発現を On/Off 可能な iPS 細胞株 (iPS-Tet/BMP-4 細胞株あるいは iPS-Tet/Amelogenin 細胞株) の樹立が確認された。

(3) BMP-4 遺伝子の転写促進が iPS 細胞の自発的分化に及ぼす影響

iPS-Tet/BMP-4 細胞株から胚葉体を作製した後に BMP-4 発現を誘導することで自発的分化を促し、各胚葉マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法で解析した。その結果、中胚葉および上皮(非神経外胚葉) 関連遺伝子の発現は上昇し、神経外胚葉と内胚葉関連遺伝子の発現は減少していたことから、iPS 細胞胚様体における BMP-4 遺伝子の転写促進は中胚葉系および非神経外胚葉系の細胞への分化を誘導することが明らかとなった。

(4) iPS 細胞の BMP-4 発現制御による軟骨への自己組織化誘導

Tet 添加 iPSCs-Tet/BMP-4 細胞をマウスに移植するとテラトーマが形成され、その内部には Tet 非添加 iPSCs-Tet/BMP-4 細胞の場合と比較して多くの軟骨組織を含有していた。iPS 細胞の軟骨細胞誘導法はいくつか報告があるが、特にマウス iPS 細胞は長期の誘導日数を要する。そこで、iPSCs-Tet/BMP-4 を用いることで軟骨分化誘導を簡便に効率的に行える可能性があるとして仮説を立てた。

iPSCs-Tet/BMP-4 を Tet 存在下で軟骨分化誘導を行うと、軟骨関連マーカー遺伝子およびタンパク質を高発現している表面滑沢な軟骨ペレットが形成された。この軟骨ペレットをラット膝蓋骨へ移植し、組織学的解析を行った結果、移植したペレットは腫瘍を形成することなく移植先に生着し、軟骨を再生した。この方法は従来の軟骨分化誘導法と比較し、誘導期間を短縮することができ、スキャホールドも要さなかった。

(5) iPS 細胞の BMP-4 発現制御による歯胚への分化誘導

iPSCs-Tet/BMP-4 細胞の胚様体における BMP-4 の発現タイミングを制御すると、嚢様構造が形成され、この構造体は口腔上皮マーカーを発現していた。この嚢様構造体から採取した細胞をマウス皮下へ移植するとテラトーマを形成し、その内部には歯胚と同様に上皮間葉相互作用により器官発生する毛包様構造が確認された。

そこで、歯の発生に関連するシグナルを人為的に操作することで iPS 細胞から歯胚への誘導を試みた。TGF- $\beta$  インヒビターをこの胚様体へ添加すると、中胚葉マーカー遺伝子の発現は減少し、非神経外胚葉マーカー遺伝子の発現が促進した。また、Wnt シグナル経路を活性化すると共に FGF 成長因子を添加することで、歯原性関連遺伝子の発現誘導が可能であった。

(6) Amelogenin 遺伝子の転写促進が iPS 細胞の歯原性上皮細胞分化に及ぼす影響

iPS-Tet/Amelogenin 細胞株をエナメル芽細胞へ分化誘導し、その過程で Amelogenin 遺伝子の転写を促進すると、上皮細胞/エナメル芽細胞関連遺伝子群の発現は亢進し、細胞外基質の著明な石灰化を認めた。従って、Amelogenin 遺伝子の転写促進は iPS 細胞の上皮細胞/エナメル芽細胞への分化を促進する可能性が示唆された。

以上の結果から、iPS 細胞における BMP-4 の転写活性が中胚葉系の軟骨組織あるいは非神経外胚葉系の細胞への分化決定に重要な役割を果たすことが示唆された。また、Amelogenin 等の歯の発生に関与する遺伝子の発現を制御することで、iPS 細胞から歯胚構成細胞への効率的な分化誘導を可能にすることが示唆された。また、本研究結果は、BMP-4 等の遺伝子発現操作によって、iPS 細胞から歯や軟骨の自己組織化を容易にする可能性を示しており、今後の再生医療への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Yamada M, Egusa H: Current bone substitutes for implant dentistry. J Prosthodont Res, 62(2): 152-161, 2018. (査読有)

DOI: 10.1016/j.jpor.2017.08.010

Niibe K, Suehiro F, Oshima M, Nishimura M, Kuboki T, Egusa H: Challenges for stem cell-based “regenerative prosthodontics”. J Prosthodont Res, 61(1):3-5, 2017.

(査読有) DOI: 10.1016/j.jpor.2016.09.001

Niibe K, Zhang M, Nakazawa K, Morikawa S, Nakagawa T, Matsuzaki Y, Egusa H: The potential of enriched mesenchymal stem cells with neural crest cell phenotypes as a cell source for regenerative dentistry. Jpn Dent Sci Rev, 53(2): 25-33, 2017.

(査読有) <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.09.001>

[学会発表](計23件)

Egusa H

Chulalongkorn University Symposium

国際シンポジウム “Trends in Regenerative Dentistry”

iPS Cell-Based Strategies for Bone Bioengineering

2018年12月7日 (Bangkok, Thailand)  
Kondo T, Okawa H, [Egusa H](#).  
Fabrication of lyophilized bioengineered bone grafts using genetically modified iPSCs  
66th Annual Meeting of JADR, Sapporo, Japan: Nov 17, 2018.  
[Egusa H](#)  
China-Japan Dental Science Symposium 2018, 国際シンポジウム  
iPS Cell-Based Strategies for Bone Tissue Engineering  
2018年10月26日 (Dalian, China)  
[Egusa H](#)  
2018 Chonnam National University School of Dentistry & Dental Hospital International Symposium 国際シンポジウム  
iPS cell-based strategies for bone and cartilage bioengineering  
2018年10月5日 (Gwangju, Korea)  
[Egusa H](#)  
5th Airlangga University Joint Scientific Meeting in Dentistry 国際シンポジウム  
iPS cell-based strategies in bone tissue engineering  
2018年10月3日 (Surabaya, Indonesia)  
Kondo T, Okawa H, Horie N, [Egusa H](#).  
A stepwise protocol for efficient osteogenic induction of human induced pluripotent stem cells  
5th Airlangga University Joint Scientific Meeting in Dentistry (JSMID)  
Surabaya, Indonesia: Oct 2, 2018.  
[Egusa H](#)  
NRCT- JSPS-JAAT Seminar at Research Expo 2018 日本学術振興会/タイ学会会議合同国際シンポジウム  
Development of a novel technology for targeted differentiation of iPS cells by Notch signaling inducible biomaterials  
2018年8月9日 (Bangkok, Thailand)  
Kondo T, Zhang M, [Egusa H](#).  
Bone tissue engineering approach by genetic modification of induced pluripotent stem cells  
13th International Workshop on Biomaterials in Interface Science  
Sendai, Japan: Aug 3, 2018.  
Kondo T, Zhang M, Kamano Y, Okawa H, [Egusa H](#).  
In vitro bone fabrication by controlled BMP2 expression in iPSCs  
96th IADR General Session, London, England: Jul. 27. 2018.86.  
[Egusa H](#)  
96th IADR General Session 国際シンポジウム  
“Biodental Engineering-Towards Real Tissue Synthesis in vitro”  
In vitro bone tissue fabrication by using iPS cells  
2018年7月26日 (London, England)  
[江草 宏](#)  
第37回 日本口腔インプラント学会 近畿・北陸支部学術大会特別講演  
インプラント臨床における再生医療の現状と挑戦  
2017年12月3日 (大津市)  
[江草 宏](#)  
第65回 国際歯科研究学会 日本部会 (JADR) 学術大会国際シンポジウム  
“Advances in iPS cell research and its application to dental medicine”  
iPS cell-based strategies in bone tissue engineering  
2017年11月19日 (東京)  
Zhang M, [Niibe K](#), Kamano Y, [Egusa H](#).  
Mesodermal/non-neuroectodermal lineage commitment of iPS cells by transcriptional activation of BMP-4  
65th Annual Meeting of JADR, Tokyo, Japan: Nov 18, 2017.  
[Egusa H](#)  
2017 Biennial Joint Congress of JPS-CPS-KAP 招待講演  
Emerging approaches for “regenerative prosthodontics”  
2017年10月20日 (Wenzhou, China)  
Zhang M, [Niibe K](#), Kamano Y, [Egusa H](#).  
The guidance of iPS cell differentiation into ameloblasts by transcriptional

activation of amelogenin

2017 Biennial Joint Congress of JPS-CPS-KAP, Wenzhou, China: Oct 20, 2017.

江草 宏

日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会 招待講演

iPS細胞を用いた骨再生医療戦略

2017年9月25日(仙台市)

Egusa H

The 2nd Annual Academic Conference of Society of Dental Research Administration, CSA 招待講演

iPS cell-based strategies in bone tissue engineering

2017年8月25日(Beijing, China)

江草 宏

第16回 日本再生医療学会総会シンポジウム

再生医療の補綴歯科治療への展開

2017年3月8日(仙台市)

江草 宏

第69回 東北地区歯科医学会 特別講演

iPS細胞が描く歯科医療の未来～これからの再生歯科医療への期待と課題～

2016年11月5日(仙台市)

江草 宏

第59回 春季日本歯周病学会学術大会

シンポジウム「大規模歯周組織再生を目指した細胞治療開発の新展開」

iPS細胞を用いた骨組織再生技術の開発

2016年5月20日(鹿児島市)

[図書](計1件)

Zhang M, Niibe K, Kondo T, Kamano Y, Saeki M, Egusa H.

Gene delivery and expression systems in induced pluripotent stem cells.

Interface Oral Health Science 2016, Eds: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N, Springer, Singapore: 121-133, 2017.

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 新部 邦透

ローマ字氏名:(NIIBE, kunimichi)

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学病院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 50468500