

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11928

研究課題名(和文) Hif1 の役割解明に基づくiPS細胞由来歯性上皮細胞への新規分化誘導方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel method for including iPS cell-derived odontogenic epithelial cells based on the elucidation of the role of Hif1a

研究代表者

吉田 倫子 (Yoshida, Michiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80746818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：臨床応用に問題のないiPS細胞由来歯性上皮細胞の分化誘導は未だ確立されていない。そこで本研究では、iPS細胞由来歯性上皮細胞の分化誘導の一助とするために、歯の発生過程における新規メカニズムの解析を行った。その結果、Hif2 が歯胚上皮の増殖および分化に関与していること、Ten-m/Odz3が間葉系幹細胞の遊走、増殖を促進していることが明らかとなった。さらには、iPS細胞由来角化細胞の樹立に成功した。以上により、HifおよびTen-m/Odz3が歯胚発生過程における生物学的メカニズムに関与することが示唆され、iPS細胞由来歯性上皮細胞の分化誘導を進めていくのに必要不可欠な成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、歯の再生医療実現に向けて、良質で安全なiPS細胞由来歯性細胞を分化誘導するための技術開発を行ってきた。iPS細胞から歯性間葉細胞さらには象牙芽細胞を誘導する方法を世界で初めて確立した。しかしながら、癌化や他種細胞の混入など臨床応用に問題のないiPS細胞由来歯性上皮細胞の分化誘導は未だ確立されていない。そこで、本研究において、歯の発生過程における新規メカニズムの解析を行い、iPS細胞由来歯性上皮細胞の分化誘導へ応用することにより、歯の再生の実用化に向けた基盤技術の開発が著しく発展し、将来の人類の健康増進に寄与する点で大きな意義を持ち、本研究が与える科学的インパクトは非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Induction of differentiation of iPS cell-derived dental epithelial cells, which has no problem in clinical application, has not yet been established. Therefore, in this study, we analyzed the novel mechanism of tooth development in order to help the differentiation induction of iPS cell-derived dental epithelial cells. As a result, it was revealed that Hif2 is involved in proliferation and differentiation of tooth germ epithelium, and that Ten-m / Odz3 promoted migration and proliferation of mesenchymal stem cells. Furthermore, we succeeded in establishing keratinocytes derived from iPS cells. These results suggest that Hif and Ten-m / Odz3 are involved in the biological mechanism of tooth germ development, and obtain essential results for promoting differentiation induction of iPS cell-derived dental epithelial cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Hif iPS 歯性上皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯科領域において、種々の疾病により失われた歯、歯周組織、および顎骨の再生医療実現に向けた研究が活発に進められている。再生医療を実現するためには、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。近年、山中らが樹立した iPS 細胞は、歯の再生医療実現に向けた細胞ソースとして期待されている。

歯の発生は、歯性上皮および間葉細胞の相互作用により生じる。そのため、再生歯の発生を実現するには、まず、iPS 細胞由来歯性上皮および間葉細胞の誘導方法を確立しなければならない。我々のグループでは、iPS 細胞から歯性間葉細胞への分化誘導方法の確立に取り組んできた。まず、マウス iPS 細胞から歯性間葉細胞の由来となる神経堤様細胞を誘導した後、Pax9 および BMP4 を遺伝子導入した結果、歯性間葉細胞と象牙芽細胞のマーカー発現が亢進した (Seki et al., Stem Cells Transl, 2015)。これは、遺伝子導入により iPS 細胞から歯性間葉細胞さらには象牙芽細胞を誘導する方法を確立した世界で初めての報告である。一方、歯性上皮細胞の分化誘導については、Arakaki らが、歯性上皮細胞株をフィーダー細胞として用い、マウス iPS 細胞と共培養することにより、ameloblastin、enamelin などの歯性上皮細胞マーカーを発現する細胞が誘導されることを報告した (J Bio Chem, 2012)。しかし、臨床応用を考えた場合、この方法には、他種細胞の混入、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ため、新しい誘導方法を確立する必要がある。

Hypoxia-inducible factor 1 (Hif1) は、低酸素ストレスに対する細胞の適応応答で中心的な役割を果たす低酸素誘導性転写因子である。これまでに、Hif1 は、神経細胞、ヘルパー T 細胞および軟骨細胞への分化制御や細胞の遊走に関与していることが報告されている。しかし、歯胚発生過程において Hif1 が果たす役割は全く不明である。歯の発生過程において、エナメル質形成が開始する時期までは歯性上皮組織に血管が存在しないことから、歯性上皮組織は低酸素であると考えられる。

このことから我々は、Hif1 が、歯の発生過程における歯性上皮組織に発現していると仮説を立てた。そこで、胎生 13.5 日齢マウス下顎臼歯歯胚における Hif1 の発現を免疫組織化学染色により解析した結果、歯性上皮組織に Hif1 の発現が認められた。この結果は、Hif1 が歯性上皮組織に発現し、歯の発生において重要な役割を担っていることを示唆する。幹細胞分化への Hif1 の作用として、ES 細胞から心筋細胞 (Kudova et al., PLoS One, 2016)、歯由来幹細胞からセメント芽細胞 (Choi et al., Tissue Eng Part A, 2013) の分化を促進することが報告された。そこで、我々は、従来、歯性上皮細胞分化に関与することが知られている Pitx2 や Epiprotein などの転写因子に加えて、Hif1 を iPS 細胞由来歯性上皮細胞への分化制御に応用することを着想した。

さらに、歯胚発生初期では歯の予定領域の上皮組織が肥厚して、間葉組織に向かって陥入を起し、周囲の間葉組織が凝集する。この上皮組織からのシグナルによって間葉組織が凝集するメカニズムには不明な点が多いため、このメカニズムに関わる因子に着目して解析を行うことにより、歯の再生に寄与することが考えられる。

以上により、我々は、歯の発生過程の歯性上皮細胞分化における Hif1 の機能的役割の解明および歯性間葉細胞凝集メカニズムの解明を行うこととした。これにより得られた知見に基づいて、iPS 細胞由来角化細胞に Hif1 を含めた歯の発生に必要な因子を遺伝子導入することにより、iPS 細胞由来歯性上皮細胞を分化誘導する計画を着想した。最終的には、樹立した iPS 細胞由来歯性上皮細胞と天然歯胚由来間葉組織を 3 次的に再構築し、人工歯胚の作製が可能であるか解析する。

### 2. 研究の目的

近年、歯の再生医療実現に向けて、細胞ソース確保の観点から、良質で安全な iPS 細胞由来歯性上皮細胞を分化誘導するための技術開発が活発に行われている。しかし、癌化や他種細胞の混入など臨床応用に問題のない iPS 細胞由来歯性上皮細胞の分化誘導は未だ確立されていない。本研究では、これらの問題点を改善するために iPS 細胞から歯性上皮細胞への新規分化誘導方法の開発を行う。胎生マウス歯胚上皮組織に Hif1 が発現することを確認したため、本研究計画として、まず、歯の発生過程における Hif1 の発現と機能の解析を行う。さらに、歯胚発生初期にみられる、上皮組織からのシグナルによって間葉組織が凝集するメカニズムの解明を行う。最終的に、Hif1 を含めた歯の発生に必要な因子を iPS 細胞に遺伝子導入することにより歯性上皮細胞を分化誘導する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Hif1 解析の方法

##### 歯胚の摘出および器官培養

野生型マウス胎仔から胎生 14.5 日齢の下顎臼歯歯胚を摘出し、器官培養 (Ikeda et al, PNAS, 2009) を行った。Hif1 の機能阻害のために、Hif1 の阻害剤である 20  $\mu$ M TC-S 7009 (TC-S) を I 型コラーゲンゲルと培地へ添加した。

##### 器官培養歯胚の計測方法

器官培養 7 日目の歯胚の位相差顕微鏡像を撮影し、それらの長径および幅径の計測を行った。

##### 歯性上皮細胞株の培養

歯性上皮細胞株を播種し、10% FBS、100 units/ml penicillin および 100 µg/ml streptomycin を含む DMEM/F12 を用いて 37°C で培養した。低酸素下での培養は、Hypoxia Chamber を用いて 1% O<sub>2</sub> 下で行われた。Hif の機能阻害のために、20 µM TC-S を培地へ添加した。

Bromodeoxyuridine (BrdU) アッセイ

BrdU In-Situ Detection Kit を用いて、製品プロトコールに従い BrdU アッセイを行った。

免疫染色

Hypoxyprobe-1 Kit を用いて、製品のプロトコールに従い、組織の低酸素を検出した。pimonidazole を妊娠 13.5, 14.5, 16.5 および 18.5 日野生型マウスの腹腔内に注射し、30 分後に胎児頭部を採取した。4% PFA で固定し、脱水した後パラフィン包埋し、組織切片を作製した。脱パラフィンした組織切片を 3% 過酸化水素により室温で 5 分間処理し、PBS で洗浄後、0.01 M クエン酸溶液に浸し電子レンジで加熱したのち、室温に 20 分間静置した。10% donkey serum 含有 PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、PBS で希釈した rabbit 抗 pimonidazole 抗体を 4°C で一晩反応させた。Hif1 および Hif2 の検出のために、脱パラフィンした組織切片を 10% donkey serum 含有 PBS によりブロッキング後、rabbit 抗 Hif1 抗体および rabbit 抗 Hif2 抗体を、4°C で一晩反応させた。歯性上皮細胞株におけるアメロプラスチン検出のために、歯性上皮細胞株を 20 µg/ml フィブロネクチンおよび 100 µg/ml IV 型コラーゲンでコーティングしたガラスボトムディッシュへ播種し、10% FBS を含む DMEM/F12 を用いて培養した。培養 6 日目に 4% PFA を用いて室温で 15 分間固定後、0.1% Triton-X100 含有 PBS を用いて室温で 15 分間処理を行った。3% BSA 含有 PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、rabbit 抗 mouse ameloblastin 抗体を 4°C で一晩反応させた。パラフィン組織切片は、donkey anti-rabbit IgG Alexa 568、歯性上皮細胞株は donkey anti-rabbit IgG Alexa 488 を室温で 1 時間反応させた。核の標識には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影し、蛍光の定量解析は ImageJ ソフトウェアを用いた。

細胞増殖の解析

12-well plate に歯性上皮細胞株を播種し、培養 3 日目に、細胞を 0.25% trypsin-EDTA にて回収し、Countess Automated Cell Counter を用いて細胞数を計測した。96-well plate に歯性上皮細胞株を播種し、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を用いて、製品のプロトコールに従い解析を行った。450 nm 吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

(2) 歯性間葉細胞凝集メカニズムの解析方法

マウス胚性腫瘍由来細胞株 (ATDC5) の培養

マウスの軟骨細胞様細胞株である ATDC5 を、12-well plate に播種し DMEM/F12、5% fetal Bovine Serum、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、10 µg/ml human transferrin、および 30 nM sodium selenite を含む増殖培地を用いて 37°C で培養した。

細胞遊走能の解析

細胞遊走能を in vitro scratch assay にて評価した。12-well plate に ATDC5 を播種し、siRNA の遺伝子導入を行った。細胞播種 2 日後にコンフルエントに達した時点で、12 µg/ml マイトマイシン C を培地に添加し、2 時間作用させた。その後 200 µl ピペットチップで直線的に細胞を除去し、培地で 1 回洗浄した後、Lipofectamine RNAiMAX と siRNA の複合体を含む増殖培地を加えた。0, 3, 6 および 9 時間後に位相差顕微鏡像を撮影した。各時間において細胞が除去された部分の幅を画像解析ソフト Cell Sense Standard を用いて計測し、細胞が除去された幅に対する細胞の遊走距離の割合を算出した。

細胞増殖の解析

12-well plate に ATDC5 を播種し、siRNA の遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 1, 2 および 3 日目に、細胞を 0.05 % trypsin / 0.53 mM EDTA にて回収し、Countess Automated Cell Counter を用いて細胞数を計測した。

(3) iPS 細胞由来角化細胞への分化誘導方法

0.1%ゼラチンを用いて、60 mm ディッシュを 37°C で 30 分間コーティングした。そのディッシュ上に、マイトマイシン C 処理された SNL feeder 細胞を播種し、10% fetal bovine serum (FBS)、50 U/ml penicillin、50 mg/ml streptomycin を含む DMEM を用いて、2 日間培養した。理研細胞バンクより購入したヒト iPS 細胞を SNL feeder 細胞上に播種し、15% FBS、0.1 mM nonessential amino acids、0.1 mM 2-mercaptoethanol、および 50 U/ml penicillin、50 mg/ml streptomycin を含む DMEM を用いて培養した。コロニーを形成し、サブコンフルエントに達した iPS 細胞を 0.25% trypsin/0.53 mM EDTA を用いて回収し、マトリゲルを用いてコーティングした 60 mm ディッシュ上に播種した。翌日から角化細胞分化誘導のために、1 µM all-trans RA と 10 ng/mL BMP4 を含んだ角化細胞無血清培地 (DKSFM) に交換し、5 日間培養した。5 日後、DKSFM のみの培地に交換し、30 日間培養した。35 日後、0.01 mg/mL fibronectin と 0.03 mg/mL collagen mixture を用いてコーティングしたディッシュ上に継代し、DKSFM 培地で 4 日間培養した。分化誘導 39 日目の RNA を回収し、上皮細胞の発現マーカーである p63 と Krt14 の発現をリアルタイム PCR にて調べた。

## 4. 研究成果

(1) Hif が歯の発生に及ぼす影響について

歯胚発生過程における Hif の発現パターンを解析した結果、蕾状期から鐘状期をとおして歯

胚は低酸素環境にあり、Hif1 と Hif2 の発現が明らかとなった。また、歯胚器官培養で Hif2 阻害剤を作用させると、エナメル芽細胞の分化亢進および増殖の低下、歯胚サイズの減少が示された。歯性上皮細胞株で Hif2 阻害剤を作用させると、エナメル芽細胞の分化亢進と増殖の低下が示された。以上により、Hif2 が歯胚上皮の増殖および分化に関与していることが明らかとなった。

### (2) Ten-m/Odz3 が歯胚発生過程における間葉細胞の凝集に及ぼす影響について

歯胚発生初期にみられる間葉細胞の凝集は、内軟骨性骨化の初期にみられる間葉細胞の凝集に類似していると考え、本実験では、マウス胚性腫瘍由来細胞株 (ATDC5) を用いて間葉細胞の凝集メカニズムの解析を行った。細胞遊走は、軟骨発生において間葉系幹細胞の凝集を促す重要な細胞プロセスである。細胞遊走に加えて、細胞増殖も間葉系幹細胞の凝集に関わる細胞プロセスである (2006 J Cell Biochem. Goldring)。本研究において、*Ten-m/Odz3* のノックダウンにより、non-differentiated ATDC5 の遊走が有意に減少し、増殖が抑制されることが明らかとなった。以上により、*Ten-m/Odz3* は間葉系幹細胞の遊走、増殖を促進し、初期の軟骨細胞分化を調整することが、初めて示唆された。したがって、歯性間葉細胞の凝集に *Ten-m/Odz3* が関与することが推測される。

### (3) iPS 細胞由来角化細胞の樹立

ヒト iPS 細胞から角化細胞への分化誘導を行った結果、上皮細胞マーカーである P63 およびサイトケラチン 14 の発現が有意に増加し、未分化マーカーである NANOG および OCT4 の発現が有意に減少した。したがって、iPS 細胞由来角化細胞を分化誘導することができ (図 1)、iPS 細胞由来歯性上皮細胞を分化誘導するために必要不可欠な結果がえられた。

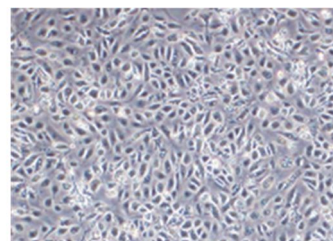


図1. iPS細胞由来角化細胞の位相差顕微鏡鏡像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oyanagi T, Takeshita N, Hara M, Ikeda E, Chida T, Seki D, Yoshida M, Seiryu M, Takano I, Kimura S, Oshima M, Tsuji T, Takano-Yamamoto T	4. 巻 9
2. 論文標題 Insulin-like growth factor 1 modulates bioengineered tooth morphogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36863-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曾木千純、竹下信郎、伊藤新、吉田倫子、大柳俊仁、藤原幾磨、山本照子
2. 発表標題 MENKは圧縮力による骨細胞のアポトーシスを抑制する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹下信郎、高野郁子、関大輔、大柳俊仁、吉田倫子、山本照子
2. 発表標題 膜タンパク質Ten-m/Odz3はFGF2によるRhoA活性制御を介してATDC5のアクチン再構成、遊走、分化を促す
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野郁子、竹下信郎、関大輔、大柳俊仁、吉田倫子、木村晴地、川津正慶、山本照子
2. 発表標題 Odz3はRhoAとアクチンの制御を介した遊走と分化の促進によりATDC5の軟骨細胞分化を調整する
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oyanagi T, Takeshita N, Hara M, Ikeda E, Chida T, Seki D, Yoshida M, Seiryu M, Takano I, Kimura S, Oshima M, Tsuji T, Takano-Yamamoto T
2. 発表標題 IGF1 regulates morphogenesis of bioengineered teeth via proliferation and differentiation of dental epithelial and mesenchymal cells.
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川津正慶、竹下信郎、吉田倫子、木村晴地、清流正弘、滝本晶、宿南知佐、山本照子
2. 発表標題 牽引力負荷された歯根膜の初期反応におけるscleraxisの発現機序と機能の解析
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 照子  (Takano-Yamamoto Teruko)  (00127250)	東北大学・歯学研究科・名誉教授   (11301)	
研究分担者	竹下 信郎  (Takeshita Nobuo)  (50431515)	東北大学・歯学研究科・助教   (11301)	
研究分担者	関 大輔  (Seki Daisuke)  (90758442)	東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師   (11301)	