

令和 元年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17148

研究課題名(和文) iPS細胞のNotchシグナル制御を基盤とした顎骨再生の試み

研究課題名(英文) Trial of jaw bone regeneration based on Notch signal regulation of iPS cells

研究代表者

鎌野 優弥 (Kamano, Yuya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70757260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤細胞分化に重要であるNotchシグナルをドキシサイクリン濃度依存的に調節することが可能である、NICD1-miPS細胞の樹立に成功した。これにより、iPS細胞の骨芽細胞分化におけるNotchシグナルの役割が検討できるようになった。
また、樹立した細胞株を用いて骨芽細胞分化を行った結果、Notchシグナルを恒常的に発現させた群では骨芽細胞分化がわずかながら抑制された。今後さらなる検討を行い、抑制機構の解明を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までにおいて、iPS細胞の骨芽細胞分化におけるNotchシグナルの役割は十分に分かっていない。今回樹立した細胞を用いることにより、iPS細胞の骨芽細胞分化におけるNotchシグナルの解明が容易になると考えられる。また、Notchシグナルは神経堤細胞分化に重要とされており、顎骨は神経堤細胞由来の骨であることから、iPS細胞を用いた顎骨再生のメカニズム解明に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in establishing NICD1-miPS cells, which can regulate Notch signal, which is important for neural crest cell differentiation, in a doxycycline concentration-dependent manner. This enabled us to examine the role of Notch signaling in osteoblast differentiation of iPS cells.

Moreover, as a result of performing osteoblast differentiation using the established cell line, in the group in which the Notch signal was constitutively expressed, osteoblast differentiation was slightly suppressed. Further studies are planned in the future to clarify the suppression mechanism.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 Notchシグナル 骨芽細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

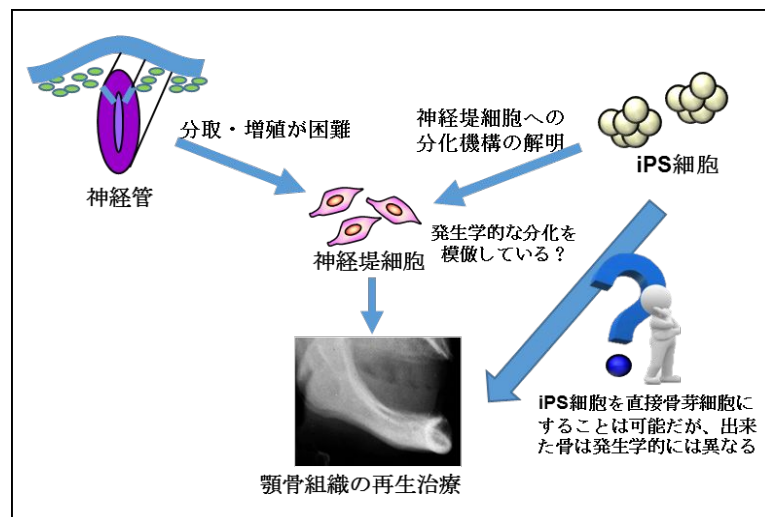
1. 研究開始当初の背景

抜歯後に生じる顎堤吸収は、インプラントあるいは義歯による補綴歯科治療を困難にし、近年、骨増生術が行われるようになってきた。現在、補綴歯科治療の顎骨再生療法としては、自家骨移植や他家骨・人工骨材量を用いた骨増生が知られている。しかしながら、自家骨移植には大きな侵襲を伴うこと、他家骨には未知の疾患の危険性、人工骨材量には十分な骨再生能が備わっていないことなどの問題点が考えられている。また、顎骨の吸収が広範囲に及ぶ場合、幹細胞等を用いた新たな骨組織再生技術に基づく新規顎骨再生療法の開発が求められている。

顎骨組織は発生学的に神経堤細胞を由来にしていることが知られている。神経堤細胞は第4の胚葉と呼ばれる神経堤から発生し、神経細胞や顎骨組織などに分化することが報告されており、顎骨組織の再生に有用な細胞であることが示唆される。しかしながら、神経堤細胞は神経管が形成される時期に、神経管の閉塞に伴って葉裂・遊走するものであり、その分取は困難である。また、分取した細胞の増殖能には限界があり、神経堤細胞そのものを顎骨再生療法の細胞源とすることには限界がある。

iPS細胞は自己の細胞から作製が可能であり、無限ともいえる増殖能および多分化能を有しており、再生治療の有用な細胞源として注目を集めている³⁾。これまで、申請者らの研究室ではマウス歯肉線維芽細胞由来のiPS細胞を用いて、高度に石灰化した骨様組織を作製することに成功している⁴⁾。しかしながら、その分子メカニズムには未だ不明な点が多く、臨床応用を目指すうえで更なるメカニズムの解明が求められている。

一方で、骨芽細胞分化にはBMPシグナル、Wntシグナル、Notchシグナルの関与が報告されている⁵⁾。このうちNotchシグナルはiPS細胞の神経堤細胞分化にも関与していることが報告されている⁶⁾。また、申請者らが再生の標的にしている顎骨組織は主に神経堤細胞由来のものであること



から、Notchシグナルにより誘導された神経堤細胞を介した骨芽細胞分化は発生の機序を模倣していると考えられる。

以上のことから、Notchシグナルによる神経堤細胞分化、さらには骨芽細胞分化のメカニズムを明らかにすることにより、iPS細胞をより顎骨の再生に適した骨芽細胞に分化誘導することが示唆される。

iPS細胞のNotchシグナルを制御する方法として、iPS細胞にNICDを強制発現させることが考えられる。しかしながら、iPS細胞は形質導入した遺伝子をサイレンシングするという特徴を持ち、目的遺伝子の強制発現が困難であると考えられていた。近年、Piggybac transposon システムを応用することにより、iPS細胞に簡便に効率よく遺伝子導入できることが報告された⁷⁾。

実際に、申請者が所属する研究室ではPiggybac transposon システムが組み込まれた発

現ベクターを用いて、iPS 細胞に特定の遺伝子を強制発現させる試みに成功している。

2. 研究の目的

以上を背景に、本研究では、Piggybac transposon システムを用いて、iPS 細胞に NICD を強制発現させることにより可能となる、『Notch シグナル制御により iPS 細胞から分化誘導された神経堤細胞は、顎骨再生における骨芽細胞の細胞源として有用である』との作業仮説を提起した。

また、この仮説を証明することにより、iPS 細胞を用いた新規顎骨再生療法の新規アプローチとなる可能性を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

Notch シグナルを制御可能な iPS 細胞を樹立した。樹立した細胞株が実際に Notch シグナルを制御できているかを遺伝子およびタンパク質レベルで検討した。さらに、樹立した細胞株を用いて、骨芽細胞分化誘導を行い、コントロールと比べて骨芽細胞分化に差があるかの検討を行った。

NICD 遺伝子制御性マウス iPS 細胞株の樹立

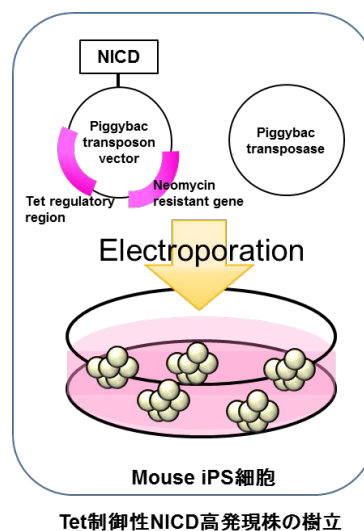
NICD 遺伝子がコーディングされたエンターベクターを購入し、トランスポゾン発現ベクターにサブクローンし、NICD 発現ベクターを作製した。作製したベクターをマウス iPS 細胞にエレクトロポレーション法により導入し、薬剤選択 (Neomycin) により安定発現株の樹立を行った。

安定株における NICD の発現を確認するため、RT-PCR 法および抗 NICD 抗体を用いた Western blotting 法を用いた。

樹立細胞株の骨芽細胞分化能を検討

樹立した NICD 遺伝子制御性マウス iPS 細胞株から分化誘導した神経堤細胞を当研究室で確立している骨分化誘導法 (Egusa ら, *J Biol Chem.* 2005) に則り、ハイドロコルチゾン、 β -グリセトフォスフェート、アスコルビン酸含有の培地で 20 日間から 30 日間培養し、骨芽細胞分化能及び骨基質産生能を評価した。

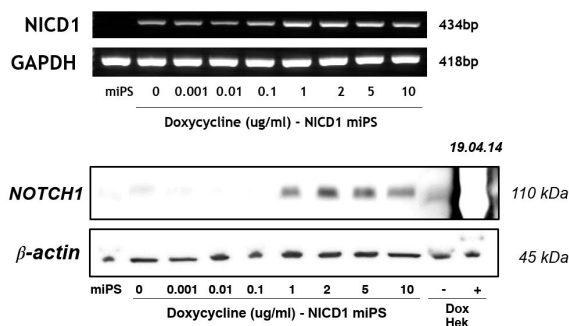
骨芽細胞分化能の評価には、組織学的評価として ALP 染色を行った。骨基質産生能の評価には von Kossa 染色を用いた。



4. 研究成果

NICD 遺伝子制御性マウス iPS 細胞株の樹立

NICD1 発現ベクターをマウス iPS 細胞に導入し、薬剤選択により NICD1 安定発現株の樹立を行った。樹立した NICD1-miPS 細胞はドキシサイクリン濃度依存的に NICD1 の発現が調節できる仕組みを持っている。実際に右図に示す通り、ドキシサイクリン濃度依存的に遺伝子レベル、タンパク質レベ



Primary Antibody: NOTCH1 Monoclonal Antibody (mN1A), Invitrogen, 1:1000

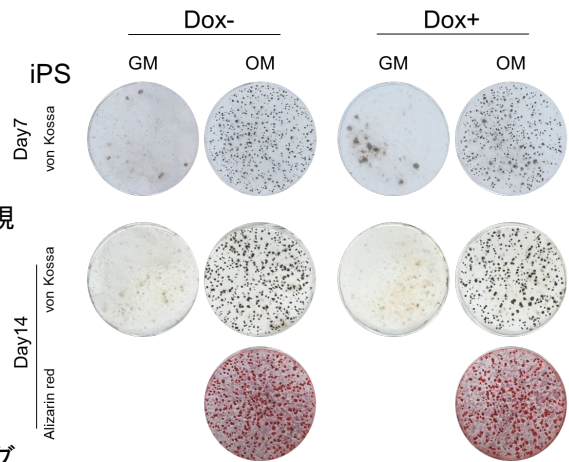
ルで NICD1 の発現が著明に上昇することが明らかとなった。このことから、目的の NICD1 遺伝子制御性マウス iPS 細胞株の樹立が成功したことが示唆される。また、この樹立細胞株はドキシサイクリン濃度依存的に Notch シグナルの下流遺伝子である Hes1, Hes5, Hey1 の遺伝子発現が有意に上昇することが確認されている(date not shown)。このことから、樹立した細胞株はドキシサイクリンを加えることにより Notch シグナルの制御が可能であることが示唆される。

樹立細胞株の骨芽細胞分化能を検討

樹立した細胞株を用いて骨芽細胞分化を行い、細胞の骨芽細胞文化における Notch シグナルの役割を検討した。

その結果、右図で示す通り、Notch シグナルを発現させた群ではやや骨器質産生が低下しており、Notch シグナルの恒常的な活性化は骨芽細胞分化を抑制する傾向があることが示唆される。

このことは、Notch シグナルが神経堤細胞分化に重要な因子であることから、初期から Notch シグナルを発現させることにより、骨芽細胞分化に重要な中胚葉への分化が抑制されたことが考えられる。今後詳細な検討を行う予定である。



5. 主な発表論文等

特記事項なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。