

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17304

研究課題名(和文) 臨床応用可能な安全で機能的なヒトiPS細胞由来歯性間葉細胞の誘導技術の開発

研究課題名(英文) Induction of differentiation of dental mesenchymal cells from human iPS cells

研究代表者

関 大輔 (Seki, Daisuke)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90758442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯の再生を実現するためには、良質で安全な細胞シーズを十分量準備するための技術開発が必要である。本研究の目的は、遺伝子導入法およびスフェロイド培養法を基軸として、効率的で安全な象牙芽細胞への分化能を有するゼノフリーヒトiPS細胞由来歯性間葉細胞の分化誘導を目指した基盤技術を確立することとした。

フィーダーフリー培養法で培養したヒトiPS細胞から歯性間葉細胞の前駆細胞である神経堤様細胞を樹立し、神経堤マーカー遺伝子の発現亢進を確認した。さらに、ヒトiPS細胞由来神経堤細胞から歯性間葉細胞への分化を誘導させるため、遺伝子導入や歯性細胞培養上清の添加を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の再生は広く社会から切望されている。歯の再生を実現するには、幹細胞から歯を構成する上皮・間葉細胞への分化誘導方法を確立しなければならない。本研究により、ヒトiPS細胞から神経堤細胞を経て歯性間葉細胞の分化を誘導する技術を開発するための基盤的知見が得られた。これらの知見に基づき、今後さらにヒトへ応用可能な、安全で効率的なiPS細胞由来歯性細胞分化技術開発の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：To achieve regeneration of tooth, we need to develop novel culture method to generate enough cells with good quality. The aim of this study is to establish methods to differentiate dental mesenchymal cells from human iPS cells using transfection and spheroid culture. I succeeded to obtain neural crest cells derived from feeder-free-cultured human iPS cells. The human iPS cell-derived neural crest cells showed expression of neural crest marker genes. I further performed transfection and conditioned medium treatment to induce the development of dental mesenchymal cell from the human iPS cell-derived neural crest cells.

研究分野：矯正歯科

キーワード：iPS細胞 歯 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療技術の進歩が目覚しく、歯科領域においても、歯の再生医療の実現のために多くの研究がなされている。2009年、我々のグループは、器官原基法を応用し、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 (Ikeda *et al.*, Proc Natl Acad Sci, 2009)。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。山中らが、マウス (Cell, 2006)、さらにヒト (Cell, 2007) の人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立して以来、歯科領域でも 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。

歯は第一鰓弓由来上皮と神経堤由来間葉組織に由来し、この両者の相互作用により発生が進行する。Otsu ら (Stem Cells Dev, 2012) や Ozeki ら (PLoS One, 2013) は、サイトカインの添加や歯性細胞との共培養法を用いることで、iPS 細胞は象牙芽細胞前駆細胞である歯性間葉細胞や、象牙芽細胞の性質を有する細胞へと分化することを報告し、iPS 細胞が歯の再生の細胞シーズ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、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。また、これらの方法により iPS 細胞から樹立された歯性細胞を用いた歯の再生は、未だに達成されていない。

2015年、我々は、マウス iPS 細胞由来神経堤様細胞に、象牙芽細胞への分化に必須な Pax9 および BMP4 の発現プラスミドを遺伝子導入することで、象牙芽細胞の前駆細胞である歯性間葉細胞と象牙芽細胞マーカーの発現が亢進し、マウス iPS 細胞由来歯性間葉細胞および象牙芽細胞へと分化することを明らかにした (Seki *et al.*, Stem Cells Trans Med, 2015)。さらに、遺伝子導入により誘導された象牙芽細胞様細胞を免疫不全マウスに皮下移植した結果、奇形腫の形成は認められず、生体安全性の高い細胞であることが示唆された (Seki *et al.*, Stem Cells Trans Med, 2015)。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、将来的なヒトでの歯の再生を目指すには、細胞シーズとして、ヒト iPS 細胞から歯形成能を有する歯性細胞をゼノフリーで誘導する必要がある。これまでにヒト iPS 細胞から歯性細胞への分化に成功した報告はなく、この技術の実現および臨床への応用が切望されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子導入法およびスフェロイド培養法を基軸として、効率的で安全な象牙芽細胞への分化能を有するゼノフリーヒト iPS 細胞由来歯性間葉細胞の分化誘導を目指した基盤技術を確立することとした。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来神経堤様細胞の樹立

フィーダーフリーで培養したヒト iPS 細胞を Y-27632 を添加した神経堤細胞誘導培地を用いて Ezsphere 上に播種し、Neurosphere の形成を行った。形成された Neurosphere を 60mm Fibronectin coated dish に播種し、アウトグロースしてきた細胞を神経堤様細胞として培養した。sphere は神経堤細胞の増殖してきたところで除去し、神経堤様細胞がサブコンフルエントに達したところで、新しい Fibronectin coated dish に継代した。その後、4% PFA を用いて iPS 細胞由来神経堤様細胞を固定し、神経堤細胞細胞マーカーとして知られている p75NTR の発現を免疫蛍光で解析した。また、RNA を回収し、遺伝子発現解析を行った。

(2) 遺伝子導入法によるヒトiPS細胞から歯性間葉細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞由来神経堤細胞様細胞に歯の発生に必須な因子であるPax9およびMsx1発現プラスミドをエレクトロポレーションで遺伝子導入し、歯性間葉細胞への誘導がなされているか検証した。遺伝子導入後の培養期間は2日とし、RNAを回収したのち、歯性間葉細胞に発現する因子の発現をリアルタイムPCRを用いて解析した。

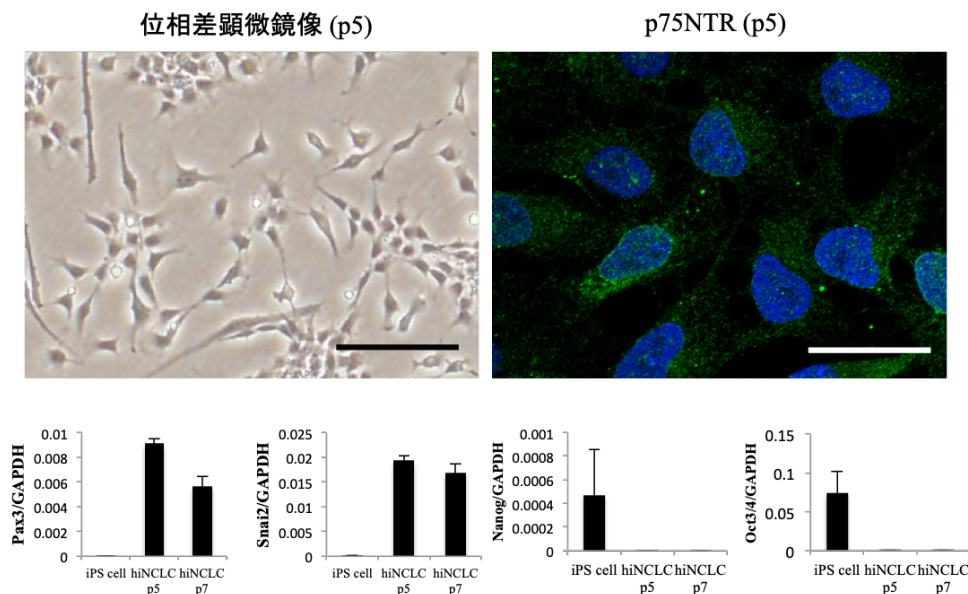
(3) マウス歯性細胞培養上清を用いたヒトiPS細胞由来歯性細胞への分化誘導

ヒト歯胚を採取する場合、Cap stageやBell stageの歯胚を取るのは困難である。また、マウスで歯性上皮細胞を誘導した報告は天然の歯性細胞との共培養を用いて誘導しているものが多い。そこで、E14.5胎生マウスの歯胚から採取した歯性細胞の培養上清を用いて、ヒトiPS細胞由来歯性細胞への分化誘導を試みた。2日間培養したEBを顕微鏡下で取り出し、1つずつ新しいEZSPHEREのwellへと移動した。培養上清は①StemFit (ヒトiPS細胞培養上清;control)②DMEM (マウス歯胚および歯性間葉細胞培養の基礎培地)③DMEM/F12 (セルラインマウス歯性上皮細胞の基礎培地)④マウス歯胚培養上清⑤マウス歯性間葉細胞培養上清⑥セルラインマウス歯性上皮細胞培養上清の6種類とした。培養7日後、EBのRNAを回収し、歯の発生に関連するマーカーの発現をリアルタイムPCRを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) ヒトiPS細胞由来神経堤様細胞の樹立

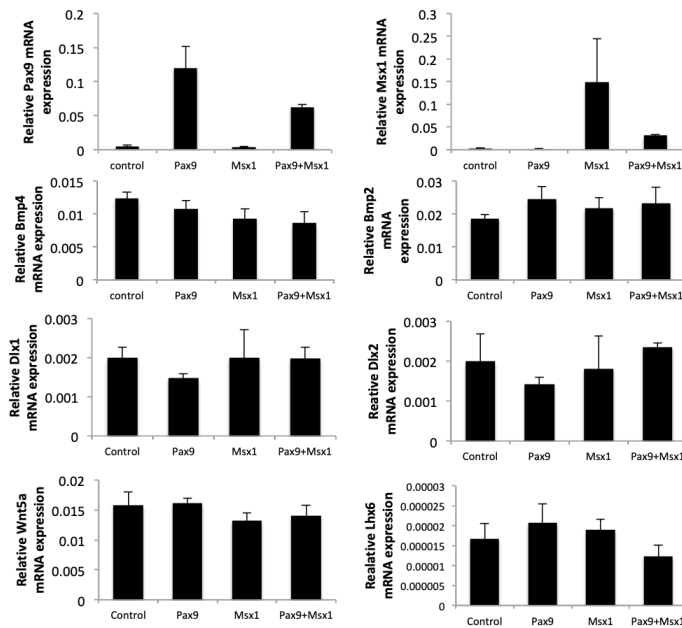
細胞形態はコロニー状から天然の神経堤細胞と類似した紡錘形の形態へと変化した。免疫蛍光解析を行った結果、神経堤細胞マーカーであるp75NTRの発現がほぼ全ての細胞で認められた。また、RNAを回収し、遺伝子発現解析を行った。その結果、ヒトiPS細胞由来神経堤様細胞では神経堤細胞マーカーであるPax3、Snai2の発現が認められ、幹細胞マーカーであるNanog、Oct3/4の発現は低下していた。



(2) ヒトiPS細胞由来神経堤細胞へのPax9およびMsx1発現プラスミドの遺伝子導入

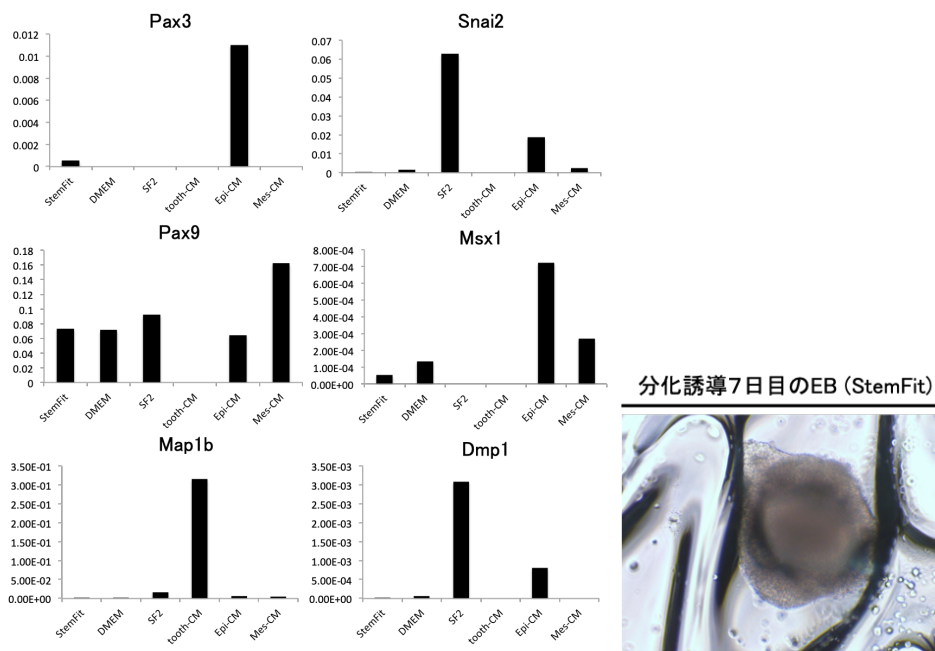
Pax9を過剰発現させたヒトiPS細胞由来神経堤細胞では、歯の発生 (bud stage-cap stage-bell stage)において歯性間葉細胞に発現する因子の発現の亢進は認められなかった。Msx1を過

剰発現させたヒト iPS 細胞由来神経堤細胞でも同様であった。また、Pax9 と Msx1 を共発現させたところ、歯性間葉細胞のマーカー因子の亢進は認められなかった。



(3) マウス歯性細胞培養上清を用いたヒト iPS 細胞由来歯性細胞への分化誘導

培養上清の違いによる EB の形態の差は認められなかった。歯胚培養上清を用いた群では象牙芽細胞マーカー Map1b の亢進が認められたが、Dmp1 や Dspp の発現は検出できなかったことから、象牙芽細胞への分化は進行していないと考えられた。歯性上皮細胞の培養上清群では、神経堤細胞マーカーの発現が亢進されるとともに、歯性間葉細胞マーカー Msx1、象牙芽細胞マーカー Dmp1 の発現も亢進された。間葉細胞の培養上清では歯性間葉細胞マーカー Pax9、Msx1 の発現が亢進されたが、神経堤細胞マーカーおよび象牙芽細胞マーカーの発現は亢進されなかった。これらの結果から、歯性上皮細胞培養上清および歯性間葉細胞培養上清はヒト iPS 細胞由来 EB の歯性細胞誘導に有効であると推察された。将来的に、これらの培養上清に含まれるタンパク質を同定し、ゼノフリー培養技術の確立に応用する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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 Scientific Reports	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 -

1. 著者名 Daisuke Seki, Nobuo Takeshita, Masahiro Seiryu, Toru Deguchi, Teruko Takano-Yamamoto	4. 巻 73
2. 論文標題 Improvement of open bite and stomatognathic function in an Axenfeld-Rieger syndrome patient by orthodontic sectional arch mechanics: Clinical considerations to risk of orthodontic tooth movement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 255-262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/56869	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshihito Oyanagi, Nobuo Takeshita, Mamiko Hara, Etsuko Ikeda, Toko Chida, Daisuke Seki, Michiko Yoshida, Masahiro Seiryu, Ikuko Takano, Seiji Kimura, Masamitsu Oshima, Takashi Tsuji, Teruko Takano-Yamamoto,
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 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress（国際学会）
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、アクチン制御を介した遊走促進および分化の促進により、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大会
4. 発表年 2018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

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----