

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19074

研究課題名(和文) iPS細胞から象牙芽細胞への分化過程における制御機構の解明と歯牙再生への応用

研究課題名(英文) Investigating the mechanism of iPS cells differentiation into odontoblast and application for tooth regeneration

研究代表者

木村 基善 (Kimura, Motoyoshi)

東京歯科大学・歯学部・レジデント

研究者番号：20822422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Cre-loxP systemによって作製したDmp1-Cre-EGFPマウスを用いて間葉系細胞から象牙芽細胞への効率的な分化方法の検討とともに遺伝子発現解析により分化制御機構を明らかにし、iPS細胞を用いた歯牙再生モデルの構築を目的に研究を行った。歯原性間葉系細胞に古典的Wntシグナル経路を活性化するGSK3 阻害剤とFGF8を添加することで、歯原性の性質維持に成功した。さらに同マウスからiPS細胞を樹立、神経堤細胞へ分化させ、セルソーターで分けた象牙芽細胞分画細胞群を歯原性上皮と組合せ再生歯胚を作製した。再生歯胚を免疫不全マウスの腎被膜下に移植を行い、歯胚の分化・成長の確認を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞は再生医療における重要なソースとして歯科分野においても注目されており、効率的かつ安全性の高い分化誘導法の確立が必須である。本研究では古典的Wntシグナルの活性化とFGF8の相互作用によって歯原性間葉系組織の歯原性の性質維持に成功した。iPS細胞から神経堤細胞への分化技術は確立しており、今後は神経堤細胞から象牙芽細胞へと分化させることが期待できる。本研究の推進により、象牙芽細胞の分化制御機構および機能の一端を明らかにするとともに、ヒトにおける歯の再生の進歩に貢献できる。将来的にはインプラントに変わる、新たな欠損補綴の開発に貢献し国民の健康とQOLの向上に寄与できる重要なデータである。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to investigate efficient differentiation method from dental mesenchymal cells to odontoblasts using Dmp1-Cre-EGFP transgenic mice generated by Cre-loxP system and establish tooth regeneration model using iPS cells. Concurrent stimulation with FGF8 and GSK3 inhibitor induced differentiation of dental mesenchymal cells into odontoblast-like cells and maintained odontogenic properties. Furthermore, iPS cells were established from derived from Dmp1-Cre-EGFP transgenic mice and differentiated into neural crest cells. Also, we constructed the bioengineered tooth germ by using the cells derived from the neural crest cells. In addition, Using the bioengineered tooth germ, we performed subrenal capsule transplantation into immunodeficient mice and evaluated the differentiation and growth of the tooth germ.

研究分野：小児歯科学

キーワード：象牙芽細胞 古典的Wnt経路 FGF8 iPS

1. 研究開始当初の背景
 歯の発生は歯原性上皮細胞と間葉系細胞の相互作用により開始される(図1)。発生初期から両者は様々なシグナル分子によってお互いを調節し、厳密に制御されている。歯原性上皮組織からはエナメル芽細胞へと、間葉系組織からは歯周組織、歯髓および象牙芽細胞へと分化し、歯の形成が行われる。間葉系組織の分化は蕾状期から帽状期移行する際に形成されるエナメル結節が複数の増殖因子を分泌するシグナルセンターとして機能し、その制御を受けている。歯の発生メカニズムに関する報告はいくつかあるものの象牙芽細胞の形成に至る詳細な分化機構は明らかにされていない。Zhengらは歯原性間葉系組織が歯原性上皮細胞との分離により、急速に歯原性を失うことを報告しており(Y Zheng et al. PLoS ONE 2016)、歯の発生における上皮-間葉の相互作用の重要性が明らかにされている。また分化段階特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いた遺伝子改変マウスを用いた転写ネットワークの探索が頻繁に行われているが、象牙芽細胞に対する探索は少ない。

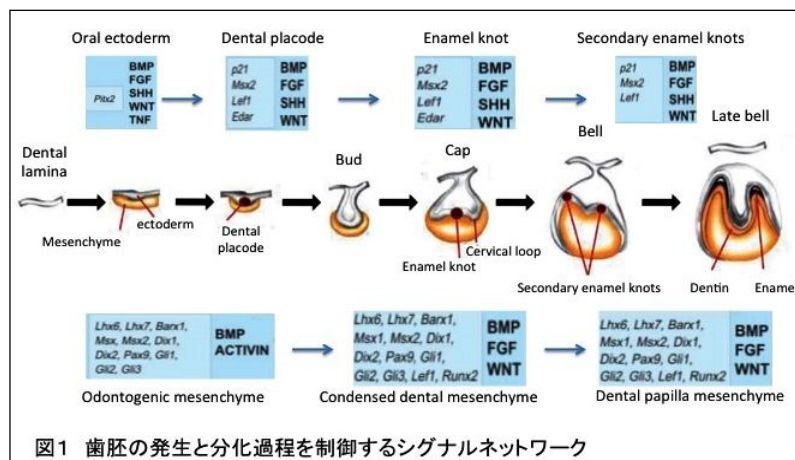


図1 歯胚の発生と分化過程を制御するシグナルネットワーク

また iPS 細胞は多分化能を有することで再生医療における重要な供給源として期待されている。器官原基である歯胚の人工的に形成した歯の立体構築モデルの報告は多くあるが、ヒトにおける歯の再生を目指すためには供給源の獲得が必要となる。iPS 細胞は多分化能を有する再生医療の重要な供給源として注目されているが、ヒトへの応用には効率的かつ安全性の高い分化誘導法の確立が必須とされている。

これまでの研究から間葉系細胞から象牙芽細胞へ分化する際に Wnt シグナル経路の1つである古典的経路が分化に重要であることと歯の発生初期から発現がみられる FGF8 の働きに着目し、歯原性間葉系幹細胞の象牙芽細胞分化を検討し、古典的 Wnt シグナル経路を活性化する GSK3 阻害剤と FGF8 を添加することで、象牙芽細胞に特異的なマーカーである Dentin sialophospho-protein(DSPP)の発現が維持されることを見出した。歯原性維持には FGF8 と WNT 古典経路の両者の活性化が関与していることが考えられるが象牙質生成には至っておらず未解明な点が多い。本研究では iPS 細胞を由来とした歯の再生を行うことを最終的な目的とし、DMP1 プロモーターを用いた象牙芽細胞分化における転写因子ネットワークの解明を学術的な「問い」に設定した。

2. 研究の目的

Dmp1-Cre-EGFP マウスを用いて間葉系細胞から象牙芽細胞への効率的な分化方法の検討とともに遺伝子発現解析により分化制御機構を明らかにし、分化した iPS 細胞を用いた歯牙再生モデルの構築を目的とする

3. 研究の方法

本研究ではまず Cre-loxP system によって作製した Dmp1-Cre-EGFP マウスの歯原性間葉系組織を採取し、FGF8 および古典的 Wnt シグナル経路の象牙芽細胞分化における相互作用の検討を行う。分化誘導した細胞にセルソーターを用いて EGFP の発現を指標として象牙芽細胞分画と非象牙芽細胞分画に分ける。その後、同マウスから iPS 細胞を樹立し神経堤から象牙芽細胞への分化を目指す。

さらにセルソーターで分けた象牙芽細胞分画細胞群を歯原性上皮と組合せ再生歯胚を作製し免疫不全マウスの腎被膜下に移植を行い、歯胚の分化・成長の確認を行う。その後同マウスを使用して下顎骨内に再生歯胚を移植する。歯牙形成が確認できた後は、天然歯と比較し成長の評価と分析を行う(図2)。

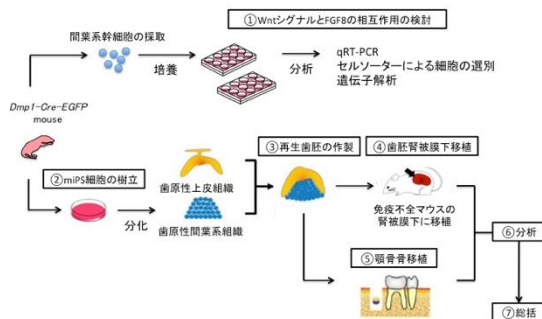


図2 研究の流れ

4. 研究成果

(1) *Dmp1-Cre-EGFP*マウス由来細胞によるWntシグナルとFGF8の相互作用の検討

Cre-loxP system によって作成した *Dmp1-Cre-EGFP* マウスの歯原性間葉系組織を採取し、FGF8 および古典的 Wnt シグナル経路の象牙芽細胞分化における相互作用の検討を行った。出生直後の同マウス第一臼歯の間葉系組織から細胞を単離したものを扱い、GSK3 阻害剤、FGF8 を添加して21日間培養を行った。その結果、GSK3 阻害剤と FGF8 の両者を添加した細胞は紡錘形を呈し、単独投与群と比較して有意な細胞増加を認めた(図3)。また、qRT-PCR 分析により、GSK3 阻害剤と FGF8 同時添加群においては、*Dmp1*、*Dspg*、*Nestin*、*Pannexin3*、*Bsp*、*Osterix* の発現レベルが単独投与群と比較して有意に増加することが認められ、古典的 Wnt 経路の活性化と FGF8 が歯胚間葉細胞の歯源性を有意に誘導することを示した(図4)。

(2) *Dmp1-Cre-EGFP*マウス由来iPS細胞の樹立と再生歯胚の作製

同マウスから iPS 細胞の樹立を行った。神経堤細胞へ分化させた後、セルソーターを用いて象牙芽細胞分画細胞群を抽出し同マウスの胎児から採取した歯源性上皮と組合せ先行研究に基づき再生歯胚を作製した(図5)。

(3) 再生歯胚の腎被膜下移植

作製した再生歯胚を先行研究に基づき4週齢の免疫不全マウスの腎被膜下に移植を行ったが、一部の歯胚においては石灰化が認められたが歯としての成長を確認することはできなかった。そのためマウス下顎骨内への再生歯胚移植に向けて培養条件などの見直しをすることとなった。本研究の内容は iPS 細胞を今後の歯科における再生医療に応用する上で今後さらに検討が必要となるデータである。歯原性間葉系細胞を効率よく象牙芽細胞へ分化誘導するために培養条件をはじめ、多方面からのメカニズムの解明が必須である。本研究においては iPS 細胞から歯牙再生へ向けた古典的 Wnt 経路と FGF8 の役割についてさらなる詳細なデータを解析し、歯牙再生療法へとつなげていく必要があると考える。

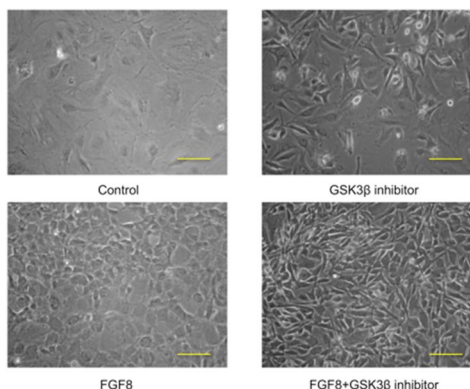


図3 GSK3β阻害剤、FGF8を用いて培養した歯原性間葉系細胞

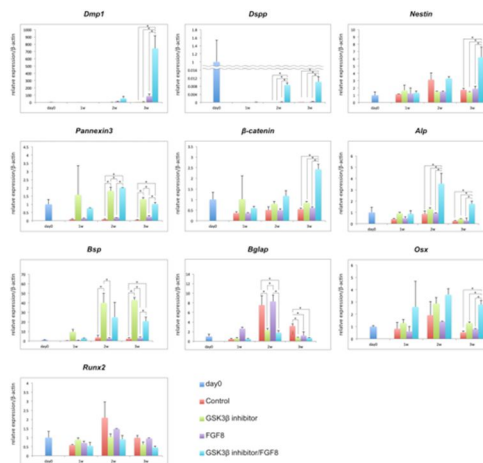


図4 qRT-PCR分析の結果



図5 作製した再生歯胚

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 Kimura Motoyoshi, Saito Akiko, Onodera Shoko, Nakamura Takashi, Suematsu Makoto, Shintani Seikou, Azuma Toshifumi	4. 巻 55
2. 論文標題 The concurrent stimulation of Wnt and FGF8 signaling induce differentiation of dental mesenchymal cells into odontoblast-like cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 8~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-021-00297-3	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Motoyoshi Kimura, Seikou Shinatani, Toshihumi Azuma
2. 発表標題 Preparation of regenerated tooth germ using iPS cell derived mesenchymal cells through interaction of FGF8 and Wnt
3. 学会等名 International Association of PaediatricDentistry 2019（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------