

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592500

研究課題名（和文）iPS細胞によるbiotooth作製のための基盤技術の開発

研究課題名（英文）Development of technical bases for biotooth formation by using iPS cells

研究代表者

藤原 尚樹（FUJIWARA NAOKI）

岩手医科大学 歯学部・講師

研究者番号：20190100

研究成果の概要（和文）：

iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells)は、これまでの研究において外胚葉、中胚葉、内胚葉すべての細胞に分化可能であることが確認されており、ES 細胞同様に歯を構成する細胞に分化させることは十分可能であると考えられる。そこでiPS 細胞から歯を構成する細胞を分化誘導し、それを用いてbiotooth を作製することは、歯の再生治療における一つの重要な技術開発と考え今回この研究計画を立案した。本計画はiPS 細胞から上皮・間葉の各細胞への分化誘導を検討し、それらの細胞とマウス歯胚由来細胞とを組み合わせることにより歯胚の組織細胞をiPS 由来細胞から作り出すことを目的とした。まず、ES細胞による研究を参考に、iPS細胞から間葉系幹細胞(MSC)を効率よく分化誘導する方法を確立した。この細胞では90%以上の細胞がMSCマーカーであるSTRO-1陽性であり、その他の間葉マーカーも陽性であった。さらに、マウスiPS細胞から歯原性間葉細胞の前駆細胞である神経堤細胞へ分化させる誘導法を開発した。この細胞は、免疫染色、リアルタイムReal Time RT-PCR, フローサイトメーターにてほとんどの細胞が神経堤細胞マーカー陽性であることが示された。また、ヌードマウスに対する移植実験にて腫瘍形成能が認められなかったことより、臨床応用への安全性が示唆された。誘導された神経堤様細胞をマウス歯胚上皮細胞と共培養することにより、この細胞が象牙芽細胞マーカーDSPを発現することが分かった。また、この遺伝子発現は、マウス歯胚上皮細胞株HAT-7のコンディションドメEDIUMでの培養において有意に増加することがわかった。この結果より、iPS細胞由来神経堤様細胞が象牙芽細胞に分化する能力をもち、歯の再生に有用な細胞ソースとなる得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Induced pluripotent stem (iPS) cells are generated from somatic cells by the simultaneous introduction of several factors; and they differentiate into the 3 embryonic germ layers with an extensive proliferative capacity. Recently, many researchers have reported that iPS cells can differentiate into different cell types, such as neurons, cardiac myocytes, and renal lineage cells, under appropriate conditions. Therefore, iPS cells have emerged as potential cell sources for tooth regeneration. In this study, we aimed to form biotooth by recombination of iPS cell-induced dental germ cells with mouse dental germ cells. First, we established the induction methods of iPS into mesenchymal stem cell (MSC). The differentiated cells expressed STRO-1, MSC marker, more than 90%, as well as other MSC markers. Further, we established a culture protocol to induce the differentiation of iPS cells into neural crest like cells (NCLC), which is a precursor cell of dental mesenchymal cells. After the induction, the most of cells expressed neural crest cells markers. The cells did not form teratomas after transplantation into nude mice subcutaneously, suggesting the safety for clinical applications. Moreover, in recombination cultures of NCLC and mouse

dental epithelium, NCLC exhibited a gene expression pattern involving dental mesenchymal cells. Some NCLC also expressed dentin sialoprotein. Conditioned medium of mouse dental epithelium cultures further enhanced the differentiation of NCLC into odontoblasts. These results suggest that iPS cells are useful cell sources for tooth regeneration and tooth development studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

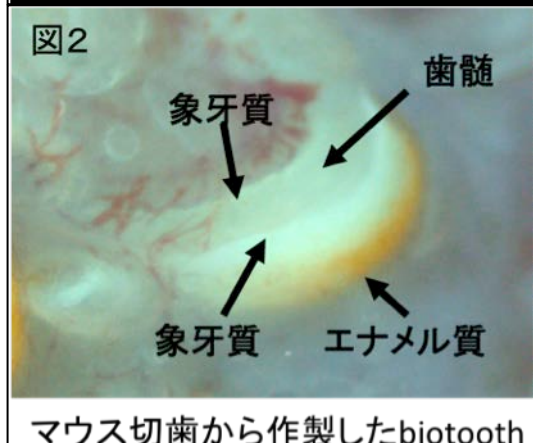
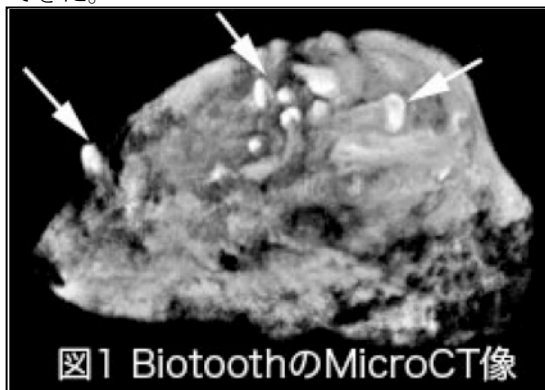
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：Biotooth, iPS細胞, 歯の再生

1. 研究開始当初の背景

我々は胎生期マウス歯胚細胞や切歯のエナメル上皮幹細胞、間葉系幹細胞を用いて「biotooth」(図1, 2)を作製する実験を行ってきた。



しかしながら、これらの研究には胎生期の歯胚や齧歯類の切歯に由来する細胞を用いるため、ヒトに応用するには問題点が多く、将来的な臨床に向けて細胞ソースをどこに求めるかという課題が残っている。

細胞による歯の再生に関する研究は、組織工学を用いてブタ歯胚細胞から歯を作り出した研究 (Yelick, J. Dent. Res., 2002) をきっかけに様々な手法を用いて研究が行われており、我々の研究室でもマウスの臼歯や切歯歯胚に由来する「biotooth」の作製に成功している(図1, 2)。

胚性幹細胞 (ES 細胞) や組織幹細胞は、それらが持つ多分化能により、biotooth を形成するための細胞ソースとして、その可能性が示唆されている (Ohazama et al., J. Dent. Res., 2004, Hu, et al., J. Dent. Res., 2006)。

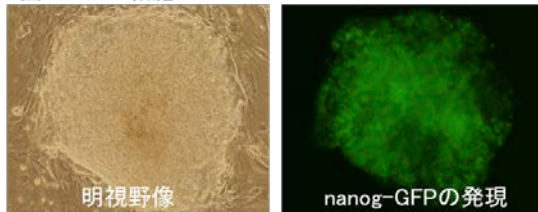
2006年に京都大学、山中教授らによって初めて発表されたiPS細胞 (induced pluripotent stem cells) は、これまでの研究において外胚葉、中胚葉、内胚葉すべての細胞に分化可能であることが確認されており、ES細胞同様に歯を構成する細胞に分化させることは十分可能であると考えられる。そこで、iPS細胞から歯を構成する細胞を分化誘導し、それを用いてbiotoothを作製することは、歯の再生治療に

おける一つの重要な技術開発と考え、今回この研究計画を立案した。

2. 研究の目的

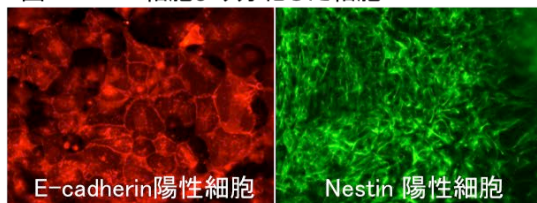
我々はすでに理化学研究所よりマウスiPS細胞の分与を受け、未分化マーカーであるnanog-GFPの発現を確認し、未分化維持のための培養条件を確立してきた(図3)。

図3 iPS細胞



本計画はiPS細胞から上皮・間葉の各細胞への分化誘導を検討し、それらの細胞とマウス歯胚由来細胞とを組み合わせることにより歯胚の組織細胞をiPS由来細胞から作り出すことを目的とした。歯胚は歯原性上皮細胞と外胚葉性間葉細胞の2つの組織が上皮間葉相互作用を経て形態形成が行われる。我々はすでにiPS細胞から上皮細胞マーカーであるE-cadherinを発現する細胞、未分化間葉細胞のマーカーであるnestin陽性反応を持つ細胞を作り出すことに成功していた(図4)。

図4 iPS細胞より分化した細胞



これらの研究をもとに、本研究では1) iPS細胞から上皮細胞を効率よく分化誘導、分離させる技術の確立、2) iPS細胞から分化した上皮細胞を歯原性間葉細胞と組み合わせることにより、歯原性上皮細胞(エナメル芽細胞)へ効率よく分化誘導させ、分離させる技術の確立、3) iPS細胞から間葉細胞を効率よく分化誘導、分離させる技術の確立、4) iPS細胞から分化した間葉細胞を歯原性上皮細胞と組み合わせることにより、歯原性間葉細胞(象牙芽細胞)へ効率よく分化誘導させ、分離させる技術の確立を行うこと、そしてこれらから得られた結果を基にiPS細胞由来の

biotoothを作製する技術を確立することを最終目標として、研究を行った。

3. 研究の方法

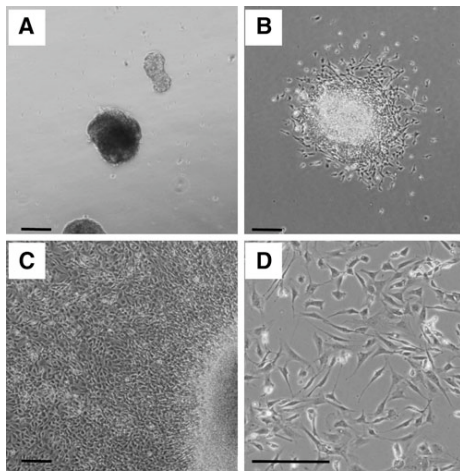
1. iPS細胞から上皮・間葉細胞、神経堤細胞を効率よく分化誘導、分離する技術の確立
ES細胞を上皮、間葉細胞に分化させる方法に準じて、培地と培養方法(通常の2次元培養、hanging drop法等)、添加因子(BMP-4, bFGF, NGF, EGF, retinoic acid等)、培養器の表面コーティング(ゼラチン、ラミニン、ファイブロネクチン、コラーゲン等)などについて、iPS細胞の適切な培養条件を検討した。
2. 分化した細胞の特性の確認
免疫染色、Real time RT-PCR, フローサイトメーターをもちい、分化誘導した細胞における細胞マーカーの発現を検討した。
3. ノードマウス皮下への移植
分化させた腫瘍を形成するかどうか、ノードマウス皮下への移植して検討した。
4. 誘導した細胞と歯胚細胞との再結合実験
iPS細胞から誘導した細胞が歯胚細胞からの刺激を受け、歯原性細胞に分化するかどうかを検討するため、マウス切歯細胞と組み合わせtrowell法にて共培養した。培養後1週間で歯原性細胞マーカー抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

1. iPS細胞から間葉細胞を効率よく分化誘導する技術の開発
ES細胞による研究を参考にし、iPS細胞から間葉系幹細胞(MSC)を効率よく分化誘導する方法を確立した。この細胞では90%以上の細胞がMSCマーカーであるSTRO-1陽性であり、その他の間葉マーカーも陽性であった。
2. iPS細胞から分化させた細胞を分離する技術の確立
 1. で分化誘導したMSCをMacs cell sorting systemを用いSTRO-1陽性細胞で選択的に分離する技術の構築に成功した。
3. iPS細胞から神経堤細胞への分化誘導法の確立

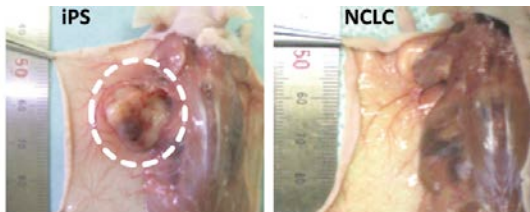
マウスiPS細胞から歯原性間葉細胞の前駆細胞である神経堤細胞へ分化させる誘導法を確立した(図5)。

図5



開発した分化誘導法を改良することで、さらに神経堤細胞マーカー陽性細胞の出現率を上げることに成功した。また、この細胞をヌードマウス皮下へ移植しても奇形腫は形成されなかった。

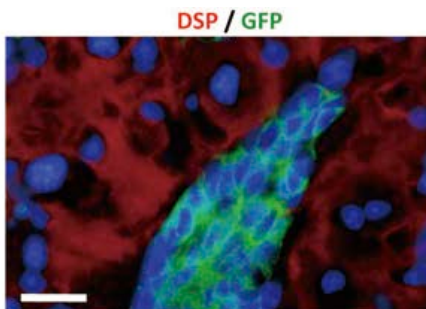
図6



4. iPS細胞由来神経堤様細胞の象牙芽細胞への分化能

3. で誘導された神経堤様細胞をマウス歯胚上皮細胞と共培養することにより、この細胞が象牙芽細胞マーカーDSPを発現することが分かった(図7)。

図7



また、この遺伝子発現は、マウス歯胚上皮細胞株HAT-7のコンディションドメディウムでの培養において増加することがわかった。さらに、誘導した細胞から磁気ビーズ法(Macs cell sorting system)にてHNK-1陽性細胞と陰性細胞を分離し、マウス歯胚上皮との共培養後のDSPの発現を比較したところ、陽性細胞がよりDSPを発現することが明らかとなり、HNK-1陽性神経堤細胞がより強い象牙芽細胞分化能をもつことが示唆された。

以上の結果は2011年に論文としてStem cells & Development誌に掲載された。

5. iPS細胞由来神経堤様細胞と歯胚細胞との組み合わせによる移植実験

iPS細胞由来神経堤様細胞と歯胚上皮細胞を組み合わせ、免疫不全マウス腎皮膜下に移植する実験をフランスの研究チームとの共同研究にて進めている。現在までに、移植後1週後の組織で、初期歯胚用の構造物が出来ることが確認されている。今後この実験をすすめ、iPS細胞由来神経堤様細胞が歯を再生させるかどうかを検討していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1) Otsu, K., Kishigami, R., Oikawa-Sasaki, A., Fukumoto, S., Yamada, A., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Harada, H.: Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. Stem Cells & Dev. e-Pub, (2011), in press (2012) 査読有
- 2) 及川 愛, 大津圭史, 藤原尚樹, 石関清人, 中富満城, 大島勇人, 原田英光: エナメル質の横紋形成メカニズムの解明 岩医大歯誌 in press (2012) 査読有
- 3) Arakaki, M., Ishikawa, M., Nakamura, T., Iwamoto, T., Yamada, A., Fukumoto, E., Saito, M., Otsu, K., Harada, H., Yamada, Y., Fukumoto, S.: Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. J. Biol. Chem. 287: 10590-10601 (2012) 査読有
- 4) Kishigami, R., Otsu, K., Oikawa-Sasaki, A., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Tabata,

- Y., Harada, H.: Histological analysis of epithelial stem cells during induced pluripotent stem cell-derived teratoma development. *J. Oral Biosci.* 54: 54-5 (2012) 査読有
- 5) Otsu, K., Kishigami, R., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Harada, H.: Functional role of Rho-kinase in ameloblast differentiation. *J. Cell Physiol.* 226: 2527-2534 (2011) 査読有
 - 6) Sakuraba, H., Fujiwara, N., Sasaki-Oikawa, A., Sakano, M., Otsu, K., Ishizeki, K., Harada, H.: Hepatocyte growth factor stimulates root growth during the development of mouse molar teeth. *J. Period. Res.* 47: 81-88 (2011) 査読有
 - 7) Akimoto, T., Fujiwara, N., Kagiya, T., Otsu, K., Ishizeki, K., Harada, H.: Establishment of Hertwig's epithelial root sheath cell line from cells involved in epithelial-mesenchymal transition. *BBRC*, 404: 308-312 (2011) 査読有
 - 8) 原田英光, 大津圭史, 藤原尚樹, 石関清人, 及川愛. 再生医学に関する新設講義の受講アンケートの結果と考察. *日歯教誌* 27: 63-68 (2011) 査読有
 - 9) Fujiwara N., Akimoto, T., Kagiya T., Ishizeki K., Harada H.: Egf signaling regulates transition from crown to root formation in the development of mouse molars. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*, 312B: 486-494 (2009) 査読有
- [学会発表] (計 31 件)
- 1) 大津圭史ら: ライブイメージングでとらえる歯の発生メカニズム (招待講演) 第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術大会. 3/26 (2012) 山梨.
 - 2) Otsu, K. et al.: The role of Rho signaling pathway in dental epithelial stem cells. 第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術大会. 3/26 (2012) 山梨.
 - 3) Otsu, K. et al.: The role of Rho signaling pathway in dental epithelial stem cells. Gordon Research Conference, Craniofacial development a regenerative medicine. 3/17-24 (2012) CA, U.S.A.
 - 4) 大津 圭史 歯の再生に向けた iPS 細胞から歯原性間葉細胞への分化誘導 第 53 回歯科基礎医学会学術大会. 10/2 (2011) 岐阜.
 - 5) 藤原尚樹ら: Hepatocyte growth factor はマウス臼歯歯胚の歯根形成を促進する. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 10/1 (2011) 岐阜.
 - 6) 及川 愛ら: アメロゲニンの概日的発現周期に関わる Msx2 の役割 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 9/31 (2011) 岐阜.
 - 7) 石関清人ら: ツチ骨とキヌタ骨の形成とメッセル軟骨との関連性 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 9/30 (2011) 岐阜.
 - 8) Otsu, K. et al.: Functional role of Rho signaling in dental epithelial stem cells, Gordon Research Conference, Bone and Tooth, 6/18-19 (2011) Les Diablerets, Switzerland.
 - 9) 原田英光ら: エナメル上皮幹細胞のライブセルイメージング. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術大会. 3/30 (2011) 横浜.
 - 10) 大津圭史ら: 歯の再生に向けた iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導. 第 10 回日本再生医療学会総会. 3/1 (2011) 東京.
 - 11) 岸上良太ら: iPS 細胞由来奇形種における上皮細胞の分化解析と歯の再生への可能性. 第 10 回日本再生医療学会総会. 3/1 (2011) 東京.
 - 12) Otsu et al.: Neural Crest like Cell from Induced Pluripotent Stem Cells for Tooth Regeneration. Frontier Meeting 2010, 2/25 (2011) Tokyo.
 - 13) Fujiwara et al.: Establishment of Hertwig's epithelial root sheath cell line from cells involved in epithelial-mesenchymal transition. Frontier Meeting 2010, 2/25 (2011) Tokyo.
 - 14) 藤原尚樹ら: Hertwig 上皮鞘細胞の特性と EMT の可能性. 52 回歯科基礎医学会学術大会並びに総会, 9/14 (2010) 東京.
 - 15) Fujiwara, N. et al: Establishment of immortalized Hertwig's epithelial root sheath cells and character of cell line. The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation. 1-4, Sep (2010) Belrin, Germany.
 - 16) Lee, J.W. et al: Biological effects of cyclic diarylheptanoids on tooth root formation. The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation. 9/1-4 (2010) Belrin, Germany.
 - 17) Sasaki-Oikawa, A. et al.: New hypothesis of cross-striation formation mechanism. The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation. 9/1-4, (2010) Belrin, Germany.
 - 18) Otsu, K. et al.: Visualizing cellular dynamics of tooth development. The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation. 9/1-4, (2010) Belrin, Germany.
 - 19) Mayama, H. et al.: Cell culture of human dental epithelium cells and its approach for regenerative dentistry. The 10th Tooth

- Morphogenesis and Differentiation. 9/1-4, (2010) Belrin, Germany.
- 20) Kishigami, R., et al.: Neural crest like cells from induced pluripotent stem cells for tooth regeneration. International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. 9/1-4, (2010) Belrin, Germany.
 - 21) Xu J, et al.: Expression of vasoactive intestinal peptide receptors in HERS cells. IADR, 7/14-17, (2010) Barcelona, Spain.
 - 22) 岸上良太ら:iPS細胞由来奇形腫における上皮細胞の分化解析と歯の再生への応用, 岩手医科大学歯学会第70回例会. 7/3 (2010) 盛岡.
 - 23) Otsu, K.: Role of Rho kinase in amelogenesis, Gordon Research Conferences, 4/9-18, (2010) Il Ciocco Hotel and Resort, Lucca, Italy.
 - 24) Harada, H.: Live cell imaging of Hertwig's epithelial root sheath formation process, Gordon Research Conferences, Gordon Research Conferences, 4/9-18, (2010) Il Ciocco Hotel and Resort, Lucca, Italy.
 - 25) 佐々木愛ら:エナメル横紋形成のメカニズムに関する新規仮説. 岩手医科大学歯学会第69回例会, 2/27 (2010) 盛岡.
 - 26) 大津圭史ら:Rho キナーゼによるエナメル芽細胞の極性制御機構. 第51回歯科基礎医学会学術大会並びに総会, 9/10 (2009) 新潟.
 - 27) 原田英光ら:ヘルトヴィッヒ上皮鞘形成過程におけるサービカルループでの細胞動態, 第51回歯科基礎医学会学術大会並びに総会, 9/10 (2009) 新潟.
 - 28) 藤原尚樹ら:再生医療安全性評価のためのセンサーマウスの開発と遺伝子導入による再生組織のイメージング, 第2回岩手医科大学歯学部オープンリサーチ中間発表, 7/25 (2009) 盛岡.
 - 29) 大津圭史ら:iPS細胞を用いた歯の再生の試み, 第2回岩手医科大学歯学部オープンリサーチ中間発表, 7/25 (2009) 盛岡.
 - 30) 間山寿代ら:ヒトエナメル上皮細胞の培養と再生への展開, 第2回岩手医科大学歯学部オープンリサーチ中間発表, 7/25 (2009) 盛岡.
 - 31) Fujiwara, N., et al.: Stimulation of root formation and regeneration by natural compound. 85th Congress of the European Orthodontic Society. 6/10, (2009), Helsinki, Finland

[図書] (計 1 件) [その他]

- 1) Otsu K. et al: Human Press SPRINGER SCIENCE, Organ Cultures and Kidney-Capsule Grafting of tooth germs, (Eds; Chrissa Kioussi

Odontogenesis: Methods and Protocols, in press

ホームページ等

1) 岩手医科大学解剖学講座発生物・再生医学分野 Web site

<http://oralhist.iwate-med.ac.jp>

2) 岩手医科大学歯学部オープンリサーチプロジェクト Web site

<http://dent-open.iwate-med.ac.jp/>

3) 歯科再生医療産学連携会議 Web site

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/anatomy1/shika-saisei/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 尚樹 (FUJIWARA NAOKI)

岩手医科大学 解剖学講座 発生物分野

研究者番号: 20190100

(2)研究分担者: 該当なし

(3)連携研究者

原田 英光 (HARADA HIDEMITSU)

岩手医科大学 歯学部 教授

研究者番号: 70271210

大津 圭史 (OTSU KEISHI)

岩手医科大学 歯学部 ポストドクター

研究者番号: 60509066