

## 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25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890022

研究課題名（和文）人工多能性幹細胞を用いた高効率エナメル芽細胞分化誘導法の確立

研究課題名（英文）Induction of ameloblasts in high efficiency  
from induced pluripotent stem cells

研究代表者

新垣 真紀子（ARAKAKI MAKIKO）

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80610675

**研究成果の概要（和文）：**iPS細胞をアメロブラスチン(Ambn) 高発現歯原性上皮細胞株SF2-24と共培養、もしくはSF2-24の培養上清を用いたconditioned medium(CM)存在下で培養することにより、iPS細胞をエナメル芽細胞に分化誘導することが可能であった。また、SF2細胞が培養液中に分泌するAmbnやNT-4、BMPシグナリングが、iPS細胞からエナメル芽細胞への分化過程において重要な役割を演じていることが示唆された。

**研究成果の概要（英文）：**iPS cells are capable to be induced to ameloblasts when iPS cells were cultured with ameloblastin (Ambn) high expression dental epithelial cell line SF2-24, or cultured in the presence of conditioned medium (CM) of SF2-24 culture supernatant. Additionally, it is indicated that soluble factors such as Ambn, NT-4 and BMP, secreted from SF2 cells to culture medium, perform an important role for differentiation iPS cells into ameloblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：iPS細胞、エナメル芽細胞、歯、再生、歯原性上皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 歯胚発生における、歯原性上皮細胞と間葉細胞間の連続した相互作用による複雑な形態制御
- (2) エナメル芽細胞の分化機序の詳細未解

- 明であり、分化誘導技術の未確立
- (3) 歯科再生医療を目的とした人工的な歯原性細胞大量調整法の必要性
- (4) 人工多能性幹細胞（iPS細胞）が有する多分化能と自己複製能

## 2. 研究の目的

- (1) 人工多能性幹細胞(iPS細胞)から歯原性上皮細胞あるいはエナメル芽細胞を効率的に分化誘導する方法の確立を目的とする
- (2) iPS細胞をエナメル芽細胞に誘導する主な因子の同定を行い、同分化誘導系への応用を行う
- (3) 誘導して得られる iPS細胞など幹細胞から歯原性上皮細胞やエナメル芽細胞への分化機序の解析を行う

## 3. 研究の方法

マウス由来 iPS細胞とアムロブラスチン(Ambn)を高発現するラット由来歯原性上皮細胞株 SF2-24 との共培養ならびに、SF2-24の conditioned medium(CM)下で培養することで iPS細胞を Ambn 発現歯原性上皮細胞へ分化誘導することにすでに成功している。

iPS細胞から効率的にエナメル芽細胞へ分化誘導するため以下の検討を行った。

### (1) 歯原性上皮細胞を用いた分化誘導法の検討

これまでの研究から、iPS細胞と Ambn 高発現の歯原性上皮細胞との共培養、さらに予備実験で、歯原性上皮細胞の培養上清を加えた培養により、iPS細胞をエナメル芽細胞に分化させることが可能であることがわかっている。そこで、iPS細胞と歯原性上皮細胞との共培養系、もしくは培養上清による分化誘導系におけるエナメル芽細胞への誘導効率を、エナメル芽細胞マーカーによる RT-PCRならびに細胞免疫染色により比較検討する。

また、iPS細胞は多分化能を有するため、上皮前駆細胞へ分化を制御することにより、歯原性上皮細胞あるいはエナメル芽細胞への高効率な分化誘導法の開発を目指す。多能性幹細胞は Wnt シグナルの抑制や BMP シグナルの促進により優位に上皮細胞へ分化することが明らかになっている。従って、それらの前処理により作製した iPS細胞塊を、歯原性上皮細胞との分化誘導系に用いる。

#### ① 分化誘導法の検討

iPS細胞と SF2 との共培養系、conditioned medium (CM)培養系におけるエナメル芽細胞マーカー Ambn、および Enam 発現を RT-PCR

により比較検討し、より効率的な培養系を確立する。

- ② iPS細胞の前処理による分化効率検討  
iPS細胞の Feeder free 培養や Dish coat 材の検討、Wnt 抑制や BMP 促進により上皮前駆細胞に誘導した後、エナメル芽細胞へ分化誘導を行う。

### (2) エナメル芽細胞への具体的な分化誘導因子の同定

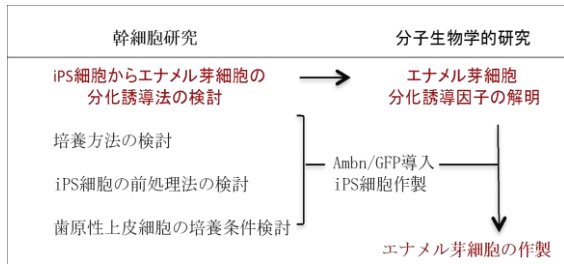
培養細胞は、サイトカイン、増殖因子、細胞外基質タンパク質、プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビターなど、細胞の機能を調節する様々なタンパク質を培養液中に分泌する。iPS細胞にエナメル芽細胞分化能を与える歯原性上皮細胞由来の要因としては、複数の因子が考えられる。直接因子としては細胞間結合分子、接着因子、そして細胞外基質タンパクが考えられる。間接因子には、歯原性上皮細胞から培養液中に分泌された増殖因子それらの活性調節因子、培養液の pH 等が考えられる。そこで、これまでの我々の研究から、細胞外基質タンパクであるアムロブラスチンを重要な誘導因子として考えているが、培養上清に含まれるタンパク質を限外ろ過法(強制循環式濃縮法(ホロファイバー)や遠心法)にて分離・精製し iPS細胞培養時に培養液に加えエナメル芽細胞のマーカー遺伝子の発現変化を解析する。主な誘導因子を同定し分化誘導系に応用する。

- ① Ambn 高発現 SF2-24 と Ambn 低発現 SF2-7 CM 培養下で iPS細胞を分化誘導し、iPS細胞由来 Ambn の発現量を比較。
- ② Ambn 低発現 SF2-24CM 培養下でエナメル芽細胞分化に関わるとされる BMP や NT-4 に対する阻害剤を添加し、iPS細胞からエナメル芽細胞分化への影響を解析。

### (3) Ambn/GFP 発現 iPS細胞を作製し、分化誘導効率を視覚的に比較

Ambn/GFP 発現 iPS細胞を作製。この iPS細胞を用いてエナメル芽細胞へ分化誘導を行い iPS細胞由来 GFP 陽性エナメル芽細胞の数や蛍光強度の比較により誘導効率を検討。

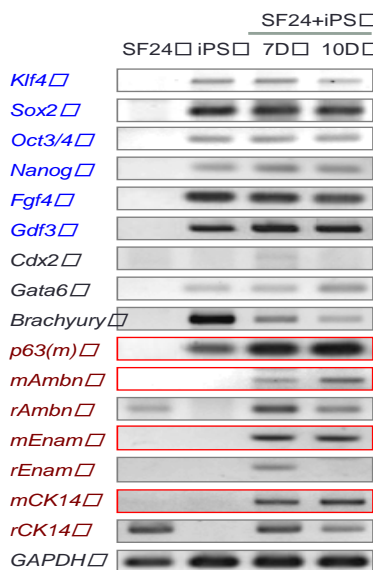
### (4) (1) ~ (3) を応用しエナメル芽細胞作製



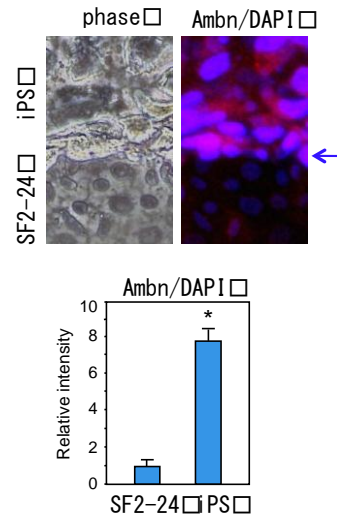
#### 4. 研究成果

本研究では、ラット由来歯原性上皮細胞とマウス由来 iPS 細胞を共培養することで、iPS 細胞をエナメル芽細胞へ分化させる方法を試みた。

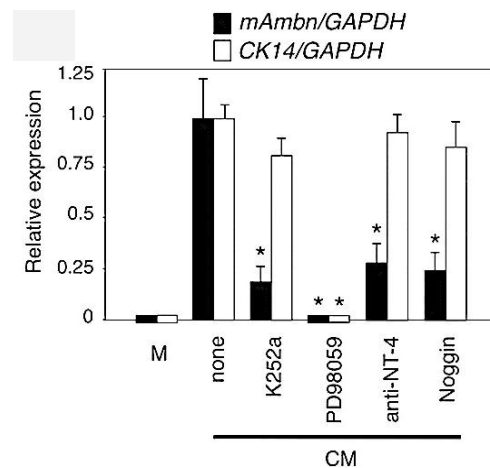
初めに、共培養に用いる歯原性上皮細胞株の樹立を行った。ラット切歯端由来の上皮細胞塊から増殖してくる細胞集団を継続培養し、より未分化な前エナメル上皮細胞集団をクローン化することで、単一細胞由来の細胞株を 30 種類樹立した。これらの細胞の中で Ambn を高発現しているラット歯原性上皮細胞株 SF2-24 を得た。この SF2-24 をフィーダー細胞として iPS 細胞を共培養した結果、6 日目に iPS 細胞集団の境界から上皮細胞に類似した細胞が出現した。そこで、共培養 7 日目と 10 日目の細胞で幹細胞マーカー、上皮細胞マーカー (p63, CK14) ならびにエナメル芽細胞のマーカー (Ambn、エナメル素 (Enam)) の発現を RT-PCR 法で解析した。結果、7 日目で外胚葉マーカー p63 は発現が上昇し、CK14 と Ambn、Enam は発現が開始していた。



さらに、共培養 1 4 日目の細胞を、抗 AMBN 抗体を用いてタンパクレベルでの発現と局在を確認した結果、iPS 細胞から生じた上皮細胞様集団において、強い AMBN 発現が確認できた。これらの結果から、iPS 細胞を Ambn 陽性のエナメル芽細胞に分化誘導することに、世界で初めて成功したといえる。



本研究期間内に、iPS細胞をAmbn低発現歯原性上皮細胞SF2-7のCMで培養した結果、iPS細胞におけるAmbn発現は誘導されなかった。また、SF2-24CMによる培養時に、抗NT-4抗体およびBMP阻害剤を加えた結果、CK14の発現増加は認められたがAmbnの発現が明らかに阻害されていた。本結果より、iPS細胞と歯原性上皮細胞株SF2-24のCM培養系によってiPS細胞をエナメル芽細胞に分化誘導することが可能であり、分化誘導に用いた細胞から分泌されるAmbnやNT-4がエナメル芽細胞への分化過程で重要な役割を演じていることが示唆された。



また、iPS細胞はType1 collagen coat上の feeder free培養でも高い未分化状態を維持し、Type4 collagen coat上では上皮系細胞へ分化しやすく、今後、iPS細胞の分化状態によるエナメル芽細胞への誘導効率について検討を行っていく予定である。

これらの結果は、iPS細胞を他の細胞と共培養することなく、これら誘導因子を利用した安全性の高い高効率エナメル芽細胞分化誘導法の確立に繋がると考えられる。

さらには、本研究により、iPS細胞から分化誘導したエナメル芽細胞が、ヒトの歯科再生医療へ繋がるのみならず、複雑な形態形成を伴う歯の発生における分子メカニズムの解明など、将来的な歯胚再生に応用する為の基礎知見にも貢献することが期待される。さらに、歯と上皮間葉相互作用によって発生する腺組織や肺、毛胞、腎臓など他の外胚葉由来器官の発生メカニズムの理解にもつながることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

①Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Yamada Y, Fukumoto S. et, al. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. The Journal of Biological Chemistry. 2012 Mar 23; 287(13): 10590-10601. [査読有]  
DOI:10.1074/jbc.M111.285874.

[学会発表] (計3件)

①Arakaki M. Dental cell differentiation from iPS cells. Sydney-Tohoku Symposium on Dentistry 2013,

2013, 1, 18 Sydney university, Australia

②新垣 真紀子. iPS細胞からエナメル芽細胞への分化誘導技術の開発と歯の再生への応用. 第54回歯科基礎医学会学術大会 2012年9月14日. 奥羽大学

③Arakaki M, Nakamura T, Fukumoto S, et. al Induction of ameloblasts from induced pluripotent stem cells. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists 2012, 5, 20 沖縄

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

新垣 真紀子 (ARAKAKI MAKIKO)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：80610675

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし