

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792058

研究課題名（和文） i P S 細胞から歯髄幹細胞への分化誘導法の開発

研究課題名（英文） Study for development of differentiation induction from iPS cell to dental pulp stem cell

研究代表者

鈴木 宏治（SUZUKI HIROHARU）

東北大学・病院・医員

研究者番号：10528087

研究成果の概要（和文）：

歯科再生医療において、現時点ですぐに臨床応用可能な技術は確立していない。歯髄幹細胞は、歯髄中に約 1 - 2 % 程度存在している細胞集団で、多分化能を有すると報告されているが、細胞数が少なく、再生治療への応用は困難である。

我々は、歯の再生医療への足がかりとして、ラット由来のアメロブラスチン高発現エナメル芽細胞株 SF24 を、フィーダーとして共培養させ、in vitro において、マウス iPS 細胞を、エナメル芽細胞に分化させた。

研究成果の概要（英文）：

It doesn't relate to the development of the technology of a possible clinical application now at once, and extent from which the application of the dental pulp stem cell that uses the deciduous tooth is reported though the treatment method for the tooth germ to reproduce is developed in the odontology department regenerative medicine.

It is reported that another differentiative potential that can differentiate into neuronal cell, fat cell, and osteoblast is possessed in the cell population in which about about 1-2% exists in the dental pulp with the dental pulp stem cell. However, it is difficult to apply it to actual reproduction treatment from few of the number of cells.

Ameloblast cell line of rat origin as feeder with mouse origin iPS cell succeeded in vitro in differentiated mouse iPS cell into the ameloblast.

The inducement of the low risk ameloblast cell is enabled more efficiently by clarifying generation and the differentiation mechanism of a more detailed ameloblast by the research in the future from this result, and using new findings and it goes as base to the clinical applications of regenerative medicines of teeth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・ 矯正・小児系歯学

キーワード：iPS 細胞、幹細胞、再生、分化誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) 医科領域における再生研究においては、ES 細胞や iPS 細胞を用いた治療法の開発と、各組織への分化誘導法の検討がおこなわれてきた。しかしながら、歯科領域における再生医療においては、歯胚再生を目的とした治療法の開発がおこなわれてはいるが、現時点ですぐに臨床応用可能な技術の開発までには結び付いておらず、乳歯を用いた歯髄幹細胞の応用について報告されている程度ではない。

歯髄幹細胞とは、歯髄中に約 1 – 2% 程度存在している細胞集団であり、神経細胞、脂肪細胞、骨芽細胞に分化しうる多分化能を有すると報告されている。しかしながら、実際の再生治療に応用するには、多分化能を有する細胞を多量に必要とするため、歯髄幹細胞をそのまま利用するには、その細胞数の少なさが問題となり、現実的には利用が困難であるといえる。

(2) 分化多能性をもつ細胞として、ES 細胞も知られているが、受精卵あるいは、受精卵より発生がすすんだ胚盤胞までの段階の初期胚が必要であるために、ES 細胞には倫理的問題がつきまとっている。それに対して、iPS 細胞は、体細胞から人工的につくられた、多能性をもつ細胞であるため、倫理的問題を回避する事ができ、拒絶反応のない再生組織の作製も可能になると考えられる。

したがって、我々の研究グループでは、再生治療に応用するための細胞数が少ないという、歯髄幹細胞の問題点を解決するために、倫理的問題を伴わない iPS 細胞を用いている。

iPS 細胞を培養する際に、フィーダー細胞という下敷きとなる細胞と共培養することにより、iPS 細胞は増殖する。我々の研究グループでは、歯の再生医療への足がかりとして、マウス由来の iPS 細胞を用いる際に、フィーダー細胞として、動物種の異なる、ラット由来のアメロブラスチン高発現エナメル芽細胞株 SF24 を用いて共培養させた。その結果、in vitro において、マウス iPS 細胞を、エナメル芽細胞に分化させることに成功した。

2. 研究の目的

歯科領域における再生治療の開発のためには、多分化能を有する細胞が多量に必要と

なる。その多量の細胞を獲得するために、iPS 細胞を用いることで、問題の解決が可能となると考えられる。

しかしながら、臨床応用に際して、再生治療を可能にするためには、より効率の良く、低リスクなエナメル芽細胞の誘導が必要である。

そのためには、今後の研究で、さらに詳細なエナメル芽細胞の発生、および分化機構について解明する必要がある。そこで得られた新しい知見を利用して、歯の再生医療の臨床応用への足がかりとしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

iPS 細胞および ES 細胞と、我々の研究グループで作成された歯髄幹細胞株を用いて、これらの細胞間における遺伝子発現について、包括的な解析をおこなう。このスクリーニングの結果から、いわゆる万能細胞から組織幹細胞への分化誘導に必要な遺伝子候補の同定をおこなう。

(1) 歯髄幹細胞特異的遺伝子の同定

マウス由来 iPS 細胞を、フィーダー細胞と共に、未分化な状態で培養し、mRNA の抽出を行う。また歯髄幹細胞株を iPS 細胞の培養に用いたフィーダー細胞と共培養し、同様に mRNA の抽出をおこなう。これら 2 つの mRNA を用いたマイクロアレイ法にて、包括的な遺伝子発現スクリーニングをおこなう。また、iPS 細胞を用いた解析と同様の手法を用いて、ES 細胞と歯髄幹細胞株との遺伝子発現の差について検討をおこなう。

(2) 歯髄細胞特異的遺伝子の発現ベクターの構築

iPS 細胞と歯髄幹細胞株、および ES 細胞と歯髄幹細胞株において発現の差の認められた遺伝子について解析し、これらの遺伝子について、真核細胞発現ベクターの構築をおこなう。

(3) iPS 細胞や ES 細胞への候補遺伝子の導入

iPS 細胞や ES 細胞に、プラスミドベクターの遺伝子導入をおこなう。候補遺伝子を組み合わせることにより、歯髄幹細胞へ分化するために必要な候補遺伝子の同定をおこなう。また、プラスミドベクターを用いた方法と全く同様の手法を用いて、siRNA や shRNA の導入による象牙芽細胞への分化能の検討をおこなう。

(4) iPS 細胞および ES 細胞からエナメル芽細胞、象牙芽細胞の分化誘導法の開発

本研究で、iPS 細胞や ES 細胞からの歯髄幹細胞への分化誘導の手技を確立することが可能である。さらに、歯髄幹細胞からエナメル芽細胞、象牙芽細胞への分化誘導について、両者を融合させることで、iPS 細胞等の多分化能を有する細胞から、直接エナメル芽細胞などの歯関連細胞へ分化誘導させる手法を確立し、歯科再生療法の臨床応用への足がかりとする。

4. 研究成果

医科領域における再生研究では、ES 細胞や iPS 細胞を用いた治療法の開発と、各組織への分化誘導法の検討がおこなわれてきた。

しかしながら、歯科再生医療において、歯胚再生を目的とした治療法の開発がおこなわれているが、現時点ですぐに臨床応用可能な技術の開発には結び付いておらず、乳歯を用いた歯髄幹細胞の応用が報告されている程度である。

また、歯髄幹細胞とは、歯髄中に約 1 – 2% 程度存在している細胞集団で、神経細胞、脂肪細胞、骨芽細胞に分化しうる多分化能を有すると報告されている。しかしながら、実際の再生治療に応用するには、細胞数の少なさから困難であると考えられる。

そのため、本研究では万能細胞から歯関連幹細胞への分化誘導法の開発を行い、再生歯科治療に十分な量の細胞を供給する方法を開発することを目的としている。

我々の研究グループでは、ES 細胞につきまわっている倫理的な問題のない、iPS 細胞を用いている。歯の再生医療への足がかりとし

て、マウス由来 iPS 細胞と、動物種の異なる、ラット由来のアメロブラスチン高発現エナメル芽細胞株 SF24 を、フィーダーとして共培養させ、in vitro において、マウス iPS 細胞を、エナメル芽細胞に分化させることに成功した。

SF24 をフィーダーとして共培養したところ、iPS 細胞由来で、ヘルトビッチの上皮鞘の上皮系マーカーであるサイトケラチン 14、上皮系マーカーである p63、歯のエナメルタンパクであるエナメルリンの遺伝子発現が PCR で検出された。

さらに、共培養後、14 日目に、エナメルタンパクであるアメロブラスチン陽性の iPS 細胞が、免疫染色法で確認された。

以上のことから、多分化能を有する iPS 細胞から、直接、歯関連細胞であるエナメル芽細胞への分化誘導が可能であることが示唆された。

すなわち、大量の細胞を入手することが可能である、ヒト以外の動物種由来の歯関連幹細胞株をフィーダーとして用いることにより、従来、再生治療に十分な量を確保する事の困難であった、ヒト由来の歯関連幹細胞を、iPS 細胞から生産できる方法の足がかりとなる知見である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. Hiroharu Suzuki, Aya Yamada, Tsutomu Iwamoto, Takashi Nakamura, Satoshi Fukumoto

The role of Gjal on salivary gland branching morphogenesis.

88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research

Barcelona, Spain July 16 2010

2. 鈴木宏治、山田亜矢、岩本勉、中村卓史、福本敏

唾液腺分岐におけるギャップ結合の役割解明と再生への応用

第 48 回 日本小児歯科学会大会、2010,5 月 19 日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 宏治 (SUZUKI HIROHARU)
東北大学・病院・医員
研究者番号：10528087

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：