

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15722

研究課題名(和文) 直接分化転換によるヒト成人皮膚・口腔粘膜細胞からの再生歯誘導の試み

研究課題名(英文) An attempt of tooth regeneration via direct transdifferentiation of human adult skin or buccal mucosal cells

研究代表者

池田 正明 (IKEDA, Masaaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：20193211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯牙を再生するためには、歯胚を形成する能力のある細胞の供給源を成体内で見つけることが重要である。本研究は、皮膚・口腔粘膜から採取できる上皮細胞と間葉細胞を、それぞれエナメル芽細胞と象牙芽細胞に分化転換することにより、再生歯の誘導を試みることを目的とした。象牙芽細胞に分化しうる間葉細胞を得るため、ヒト脂肪幹細胞を用いて小分子化合物・増殖因子のスクリーニングをおこなった。その結果、免疫不全マウスに移植後、軟骨内骨化による骨形成を誘導できる幹細胞を得ることに成功した。現在、エナメル芽細胞に分化できる上皮細胞を得るためにヒト正常表皮角化細胞を用いて研究を続けている。

研究成果の概要(英文)：In order to regenerate human teeth, it is important to find a source of cells capable of forming tooth germ in adult tissue. The objective of this study is to transdifferentiate epithelial and mesenchymal cells that can be obtained from skin or oral mucosa into ameloblasts and odontoblasts, respectively. To obtain mesenchymal cells capable of differentiating into odontoblasts, we screened small chemical compounds / growth factors using human adipose-derived stem cells. We succeeded in obtaining stem-like cells that can form bone through endochondral ossification after transplantation into immunodeficient mice. We continue to do experiments to find conditions to obtain undifferentiated epithelial cells capable of differentiating into ameloblasts from human normal skin keratinocytes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：再生歯 上皮細胞 間葉系幹細胞 分化転換 脂肪幹細胞 軟骨 軟骨内骨化

## 1. 研究開始当初の背景

辻らの研究により、胎生期のマウス歯胚から上皮組織と間葉組織を取り出して三次元培養し、マウスの体内に移植すると機能的な再生歯が形成されることが示されている。しかしながら、人間で実用化する場合には、歯胚を構成する細胞の供給源を見つけることが大きな課題となっている。最近、iPS細胞を細胞の供給源として用い、エナメル芽細胞および象牙芽細胞に分化させる研究が報告されている。しかしながら、iPS細胞は移植後、腫瘍を作る危険性が指摘されているとともに、iPS細胞の作成、安定した供給、および維持・管理には多大な時間、労力およびコストがかかる。したがって、多くの患者に対してiPS細胞を用いた歯の再生医療をおこなうことは、非常に難しいのが現状である。

iPS細胞を介さずに直接必要な細胞に分化転換させる技術は、直接分化転換法(ダイレクト・リプログラミング)と呼ばれ、再生医療の新しい手法として大きな注目を集めている。さらに最近、DNAメチル化などのエピジェネティックな標識を変換することのできる小分子化合物が続々と報告され、外来遺伝子の導入をおこなわずに小分子化合物のみでおこなう方法(ケミカル・リプログラミング)による分化転換の成功例が報告されている。

最近、研究代表者らは、外来性の遺伝子導入やウイルスベクターを用いずにヒト線維芽細胞を骨・軟骨・脂肪細胞に分化転換することを試みた。細胞は8回以上継代(分裂回数23回以上)したヒト正常皮膚線維芽細胞を用い、様々な組み合わせの小分子化合物・増殖因子を含んだリプログラミング・分化転換培地で培養した後、分化誘導をおこなった。その結果、石灰化および脂肪染色陽性細胞を誘導できる小分子化合物・増殖因子の組み合わせを見出した。ハイドロキシアパタイトを含む担体とともにヌードマウスに移植したところ、新生骨様組織の形成を認めた。さらに遠心管培養法により、軟骨細胞への分化誘導をおこなった結果、アルシアンブルー陽性の細胞塊が形成された(未発表データ)。脂肪細胞に分化転換した細胞の割合を算定したところ、50%近い分化転換効率を示した。以上の結果は、ケミカル・リプログラミングによって、ヒト線維芽細胞を骨・軟骨・脂肪細胞に分化する多分化能をもつ未分化間葉細胞に直接分化転換できることを示唆している。

## 2. 研究の目的

胎生期のマウス歯胚から上皮組織と間葉組織を取り出して三次元培養し、マウスの体内に移植すると機能的な再生歯が形成されることが報告されている。しかしながら、ヒト歯牙を再生するためには、歯胚を形成する能力のある細胞の供給源を成体内で見つけ

ることが重要である。そこで本研究は、皮膚・口腔粘膜から採取した上皮細胞(表皮角化細胞・粘膜上皮細胞)と間葉細胞を、多分化能のある未分化上皮・間葉細胞に転換できる小分子化合物を同定する。次に、得られた未分化上皮・間葉細胞に対してエナメル芽細胞および象牙芽細胞に分化させる働きのある成長因子および小分子化合物をスクリーニングすると共に、上皮・間葉細胞を組み合わせた三次元培養をおこなう。最後に三次元培養した細胞を免疫不全マウスの腎皮膜下に移植することにより上皮・間葉相互作用による自己組織化を促し、エナメル芽細胞および象牙芽細胞へ分化と再生歯形成を誘導することを旨とする。

## 3. 研究の方法

(1) 分化転換に最適な増殖因子・小分子化合物をスクリーニングし、ヒト表皮角化細胞・粘膜上皮細胞と線維芽細胞をそれぞれ多分化能のある未分化上皮および間葉細胞に転換できる培養系を確立する。

(2) 得られた未分化上皮・間葉細胞をそれぞれエナメル芽細胞および象牙芽細胞に分化転換するために必要な増殖因子、小分子化合物を検索すると共に、上皮および間葉細胞を組み合わせた三次元培養をおこない分化誘導を試みる。

(3) 得られた三次元培養細胞を免疫不全マウスに移植して生体内での再生歯形成能を調べる。

## 4. 研究成果

(1) まず、多分化能のある未分化間葉系細胞を得るための検討をおこなった。ヒト線維芽細胞を用い、幹細胞の誘導と増殖に効果のある小分子化合物・増殖因子のスクリーニングをおこなった。その結果、線維芽細胞を骨・軟骨・脂肪細胞に分化転換できる条件を見出した。しかしながら、転換効率が低く、今後の研究に使用するには分化能が不十分であるとの結論に達した。

脂肪組織由来の間葉系幹細胞(脂肪幹細胞)は、高齢者を含む幅広い年齢層から比較的容易に採取でき、患者自身の細胞を用いる「自家移植」に適した細胞の供給源である。そこで脂肪幹細胞を用いて同様の検討をおこなった結果、生体内に移植後、石灰化肥大軟骨を形成し、軟骨内骨化による骨形成を誘導できる非常に分化能の高い細胞を得ることに成功した(特許申請準備中)。細胞の象牙芽細胞への分化能については不明であるが、以上の成果は、新しい骨再生療法の開発につながる成果であると考えられる。

現在の骨の再生療法において、血液供給の不足に起因する移植組織の壊死・脱離が問題

となっている。血液循環を改善させる手段として、骨欠損部に軟骨を移植し、軟骨内骨化を再現させる方法が注目されている。軟骨内骨化過程において肥大軟骨は、血液循環の乏しい低栄養・低酸素の環境でも抵抗性もち、血管新生を誘導するとともに、石灰化を開始し、骨を形成する。この骨再生法を臨床に応用するための一番の難題は、移植に用いる肥大軟骨の供給源である。本研究の成果は、軟骨内骨化の過程を再現させて骨を再生させる再生療法の供給源として脂肪幹細胞が有望であることを示唆している。軟骨内骨化を介した骨再生法は、従来法の問題点であった血液循環の問題を解決するための有効な手段であると考えられ、将来、この方法が実用化されれば従来法に代わる画期的な再生療法の開発につながると考えられる。

(2) さらに本研究では、多分化能をもつ間葉系細胞の増殖能と分化能を長期間培養下で維持するための培養条件の検討をおこなった。多分化能をもつことが知られている骨髄由来の間葉系幹細胞を用いて検討をおこなった結果、多分化能を持った間葉系幹細胞を長期間で継代培養することに成功した。さらに長期間培養後も細胞は骨・軟骨・脂肪細胞への分化能を保っていることを確認した。

骨髄由来の間葉系幹細胞は、高い骨・軟骨分化能を持っているが、骨髄中に存在する数が極めて少なく、高齢者になると採取が困難になるという欠点がある。さらに継代と共に自己複製能と多分化能を失っていくことが問題で、この傾向は高齢者から採取した細胞の場合により顕著であると言われている。したがって、高い多分化能を維持まま大量に培養することは難しく、大きな欠損を伴う組織の再生に用いることが困難となっている。本研究によって明らかになった間葉系幹細胞の長期継代培養法は、成体幹細胞を硬組織再生療法の発展に寄与すると考えられる。

(3) 一方、上皮系細胞についても、ヒト正常皮膚角化細胞を用いて上記と同様の検討をおこなった。しかしながら、皮膚角化細胞は数継代後に増殖を停止し、未分化状態を維持したまま増殖を維持できる条件を見出すことはできなかった。

エナメル芽細胞と象牙芽細胞は互いに相互作用（上皮間葉相互作用）しながら分化することから、両者の分化誘導には、互いを共存させた培養が必要であると考えられる。本研究で得られた間葉系細胞は象牙芽細胞への分化能をもつ可能性があると考えているが、本研究期間内に上皮系細胞を得ることができなかったために上皮系・間葉系細胞を用いた三次元培養法の検討をおこなうことができなかった。今後、ヒト歯牙の再生を目指すためには、未分化上皮系細胞を得る方法を確

立することが重要な課題であると考えられる。

## 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）

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Tsuchida N, Ikeda MA, Grieco M, Vecchio G FUCA1 is induced by wild-type p53 and expressed at different levels in thyroid cancers depending on p53 status. *Int. J. Oncol.* (査読有) 50(6) 2043-2048 (2017) doi: 10.3892/ijo.2017.3968.

Zhang K, Ikeda Y, Kasugai S, Ikeda MA Extended Culture Conditions for Multipotent Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Stomatol Soci Japan* (査読有) 83 (1) 13-23 (2016)

Pratama E, Tian X, Lestari W, Iseki S, Ichwan S J A, Ikeda MA Critical role of ARID3B in the expression of pro-apoptotic p53-target genes and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 468, 248-254 (2015) doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.121

Ikeda Y, Ikeda MA Cyclin E marks quiescent neural stem cells and caspase-3-positive newborn cells during adult hippocampal neurogenesis in mice. *Neurosci Lett.* (査読有) 607:90-96 (2015) doi: 10.1016/j.neulet.2015.09.017.

Tsuchida E, Kaida A, Pratama E, Ikeda MA, Suzuki K, Harada K, Miura M. Effect of X-Irradiation at Different Stages in the Cell Cycle on Individual Cell-Based Kinetics in an Asynchronous Cell Population. *PLoS One.* (査読有) 10(6): e0128090. (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0128090. eCollection 2015

〔学会発表〕(計 8 件)

Xiaohui Tian, Shohei Kasugai, Masa-Aki Ikeda "Investigation of culture conditions for enhancing the proliferation and osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells" 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年

Nobuo Tsuchida, Alessia Parascandolo, Masa-Aki Ikeda, Maria D Castellone, Giancarloa Vecchio “ p53-inducible FUCA1 attenuates aggressiveness of thyroid and breast cancers. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年

Saadat KASM, Pratama E, Lestari W, Ma T, Ohtani K, Ikeda MA “ Critical role of ARID3B in the expression of E2F-responsive genes and cell proliferation.” 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年

Arman K, Igci YZ, Saadat KASM, Altan Z, Sahin Y, Ikeda MA, Igci M. “ Opposite roles of lncRNA ERICD (E2F1-regulated inhibitor of cell death) and ARID3A (AT-rich interaction domain 3A) in osteosarcoma, glioblastoma and lung cancer.” The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 282-283, The 41th FEBS Congress, 2016

Ikeda, MA “ Novel Candidates of Therapeutic Targets for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Defined by Recent Comprehensive Mutation Analysis “ The 17th Scientific and Refresher Course in Dentistry (KPKIKG 2016), 2016

Pratama E, Saadat KASM, Lestari W, Ichwan S, Iseki S, Ohtani K, Ikeda MA “ ARID3B promotes gene expression critical for E2f-mediated cell cycle progression and p53-mediated apoptosis.” 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年

Saadat KASM, Kaifee A, Ahmet A, Iseki S, Ohtani K, Ikeda MA “ Expression study of E2F-target genes in osteosarcoma (U2OS) and glioblastoma (T98G) cell lines after knocking down ARID3A and ARID3B. XIV. National Congress of Medical Biology and Genetics, 2015

Saadat KASM, Kaifee A, Ahmet A, Ohtani K, Ikeda MA “ Overexpression of ARID3 facilitates E2F-dependent apoptosis” XIV. National Congress of Medical Biology and Genetics, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

池田 正明 (IKEDA, Masaaki)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・准教授  
研究者番号：20193211

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )