

令和元年6月19日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03182

研究課題名(和文) iPS細胞由来口腔上皮細胞を大量調製するための培養基材の設計

研究課題名(英文) Designing culture substrates that permit efficient expansion of iPS cell-derived oral epithelial cells

研究代表者

加藤 功一 (Kato, Koichi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：50283875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞由来口腔上皮細胞を効率よく得るための方法について検討した。まず、神経栄養因子模倣ペプチドを表面に固定化した培養基材を作製し、その表面でiPS細胞由来口腔上皮細胞を培養したが、十分な効果は見出せなかった。次に、固定化タンパク質としての細胞外マトリックスの効果について検討した。その結果、細胞外マトリックスは口腔上皮様細胞の分化誘導を促進する効果のあることが示された。一方、分化誘導培養時にEGFを添加すると一定の効果のあることも明らかになった。ただし、その添加時期が分化誘導効率に大きく影響を及ぼすこと、また、その効果がEGFによるTrkBシグナルの増強に起因することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の完全再生に関する技術は、これまでにすでに大きな進展がみられ、その可能性がすでに実証されている。しかし、この技術を医療として確立するには、口腔上皮細胞の入手法が確立されることが不可欠である。本研究の成果は、患者自身の体細胞をもとに口腔上皮細胞を必要量入手するための方法の確立に寄与するであろう。また、口腔上皮細胞を入手できるようになれば、う蝕歯のエナメル質再生療法も可能になるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：A method for efficiently obtaining iPS cell-derived oral epithelial cells was examined. First, we prepared a culture substrate on which a neurotrophic factor mimetic peptide was immobilized, and cultured iPS cell-derived oral epithelial cells on the surface. We found that the substrate was not effective for expanding iPS cell-derived oral epithelial cells. Next, the effect of surface-immobilized extracellular matrices was examined. As a result, extracellular matrices were found to be effective in the induction of oral epithelial-like cells. On the other hand, addition of EGF during differentiation culture also proved to be effective. It was further found that the timing of EGF addition greatly affects the induction efficiency, and that the effect is due to the enhancement of TrkB signaling by EGF.

研究分野：生体材料学

キーワード：iPS細胞 口腔上皮細胞 培養基材 神経栄養因子 細胞外マトリックス 上皮増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では約 70%の人が歯周病に罹患しており、そのうち重症患者は約 700 万人にも上ると言われている。歯周病は歯を喪失するもっとも大きな原因であるが、一旦永久歯が失われると再び元に戻ることはなく、口腔機能の低下のみならず、その後の生活の質は著しく損なわれる。現在、歯を喪失した場合の治療として、義歯の装着や口腔インプラントの埋込みが行われているが、究極の治療法は本物の歯を完全再生させることであろう。

このような背景から、これまでに歯の完全再生に関する研究が数多くなされてきた。すでに 1960 年初頭に Glasstone らは、胎児の歯胚（歯の原基）が、体外で培養した場合であっても正常な発生過程を辿り、エナメル質や象牙質をもつ歯になることを報告している（Arch Oral Biol 1964, 9:27）。また近年になって Ohazama らは、胎児由来の口腔上皮細胞と間葉系細胞から歯胚に類似した組織を体外で作製し、これを成体内に移植することによって天然歯に類似した歯を再生させることに成功した（J Dent Res 2004, 83:518）。これらの研究の結果、現在では、口腔上皮細胞および分化度の低い間葉系細胞を組み合わせ、上皮 - 間葉相互作用を適切に行わせることによって、発生過程を再現させ、その結果、天然に近い再生歯を作ることが可能であると考えられるようになった。

このような状況のもと、歯の完全再生に向けて次に解決すべきもっとも大きな課題は、それらの細胞を確保するための方法の確立であると本研究の当初考えられた。上記の二種類の細胞のうち間葉系細胞については、例えば成体の骨髄や歯髄から得られる間葉系幹細胞を用いることができることが報告されている。しかしながら、十分な数の口腔上皮細胞を入手する有効な手段は確立されていないのが現状である。そのような背景で、とくに口腔上皮細胞を大量かつ安全に増幅できる培養技術の確立が望まれていた。

それまでに、口腔上皮細胞の作製法について、本邦の 3 つの研究グループ（我々を含む）によって報告がなされていた。

一つは、成体のヒト皮膚表皮由来細胞内で転写因子 Thymosin beta 4 を強制発現することによって、口腔上皮様細胞へとダイレクトリプログラミングする方法である（Kiyoshima T, *et al.*, Stem Cell Res 2014, 12:309）。しかしながら、その分子機序は十分には解明されていない。

一方、iPS 細胞は、口腔上皮細胞と共培養することによって、エナメル芽細胞マーカーを発現する細胞へと分化誘導されることが報告されている（Araki M, *et al.*, J Biol Chem 2012, 287:10590）。しかしながら、同方法では口腔上皮細胞を予め準備する必要があり、その取得をどうするかという課題は依然解決されていない。

我々は、それまでの研究で、マウス iPS 細胞から神経栄養因子 NT-4 の存在下で胚様体を形成させることによって、口腔上皮細胞に特有の種々の分化マーカーを発現する細胞が高い効率で誘導されることを学会等において報告した。その培養過程で無血清培地を用いることによって分化誘導効率が向上することも見出した。我々が見出した口腔上皮細胞誘導法は、明確な因子を用いて行うことが可能であり、また、動物由来成分を排した培養系への展開も期待できる方法であった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が見出した iPS 細胞由来口腔上皮細胞の誘導法をもとにして、高純度で分量の口腔上皮細胞を得るためのクローズドシステム培養器の設計を行うことを所期の目的として研究を開始した。

研究代表者の加藤は、以前に、ラット神経幹細胞を選択的かつ迅速に増殖させるための培養基材の開発に取り組んできた。神経幹細胞が上皮増殖因子（EGF）受容体を特異的に発現する

ため、EGF を表面固定した基材上に神経幹細胞が選択的に接着し、さらに EGF の刺激を受けて活発に増殖することを見出した。その結果、高純度 (>98%) の神経幹細胞を迅速に得ることができるようになった (Nakaji-Hirabayashi T, *et al.*, Biomaterials 2007, 28:3517; Nakaji-Hirabayashi T, *et al.*, Bioconjugate Chem 2009, 20:102)。同様の技術はヒト神経前駆細胞にも適用可能であった (Konagaya S, *et al.*, Biomaterials 2013, 34:6008)。そのような基材開発から導出された設計指針、すなわち増殖因子を表面固定した基材を作製すれば、目的細胞の選択的捕捉と分裂促進が可能になるという基本的な考え方を、本申請課題で取り組む口腔上皮細胞の選択的増幅に応用することとした。

一方、研究を進める中で、我々が見出した iPS 細胞由来口腔上皮細胞の誘導法において、培養条件の最適化について更に検討を進めることの重要性に気付き、研究の後半では、とくに培地の組成、分化誘導培養の行い方、接着培養における細胞外マトリックスの効果などについて検討することを第一の目的とした。

3 . 研究の方法

(1) NT-4 あるいはそのペプチド類似体を表面に固定した培養基材を設計する。その表面で、マウス iPS 細胞から誘導した口腔上皮細胞を含む集団を培養し、設計した基材の有効性を評価する。

(2) マウス iPS 細胞から口腔上皮細胞を分化誘導する方法に関して、培養条件の最適化を行う。その際とくに、胚様体形成時の細胞播種数、上皮増殖因子の添加、接着培養における細胞外マトリックス・コーティングの影響に焦点を絞る。

4 . 研究成果

NT-4 および NT-4 の機能を模倣したペプチドを表面に固定化した培養基材の作製を試みた。まず、Williams らによる既往の研究をもとに、天然型 NT-4 と類似の機能を持つと考えられているペプチドに関する情報を取得し、それをもとに、基材固定に適した配列をもつ NT-4 類似ペプチドを設計した。このペプチドをガラス基材上に形成したアルカンチオール単分子膜表面に固定する方法について検討した。その結果、末端にカルボン酸をもつアルカンチオールを用いて形成させた自己組織化単分子膜を利用して、NT-4 類似ペプチドをキレート反応を介して固定することが可能になった。その反応過程に関して、表面プラズモン共鳴法やタンパク質アッセイ法を用いて評価した。さらに、このような表面における iPS 細胞の培養に関して検討を進めた。その結果、口腔上皮細胞を効率よく増殖させるには決して効果的な方法ではないことがわかった。

固定化タンパク質として、生体内において上皮系細胞の足場となる基底膜に存在するラミニン及びコラーゲンの変性物であり、iPS 細胞の接着培養に頻りに用いられるゼラチンの 2 つ細胞外マトリックスに焦点を当て、それらを基材表面にコーティングする効果について検討を加えた。その結果、それらの細胞外マトリックスは、口腔上皮様細胞の出現頻度を上昇させ、iPS 細胞から口腔上皮様細胞の分化誘導を促進する効果のあることが示された。また、それらのコーティング表面では、胚様体形成工程を介さず、iPS 細胞を単層培養によって口腔上皮細胞へと誘導することも可能であることがわかった。

分化誘導培養条件の最適化には、とくに、胚様体形成時の細胞播種密度および上皮成長因子 (EGF) の添加が歯原性上皮細胞様細胞形成に及ぼす効果について検討した。歯原性上皮細胞様細胞への分化の指標には、iPS 細胞から種々の上皮細胞への分化の指標として用いられている cytokeratin 14 および p63、全エナメルタンパクのおよそ 90% を占め、さらに歯の発生過程において他のエナメルタンパクに先行して帽状期より mRNA の発現を認める amelogenin

の3つを用いた。その結果、EGFの添加に一定の効果のあることが明らかになった。ただし、その添加時期が分化誘導効率に大きく影響を及ぼすこと、そして、その効果がEGFによるTrkBシグナルの増強に起因することを明らかにした。

歯の完全再生に関する技術は、これまでにすでに大きな進展がみられ、その可能性がすでに実証されている。しかし、このような技術を医療として確立するには、細胞ソースの問題を解決しなければならない。本研究の成果は、患者自身の体細胞をもとに口腔上皮細胞を必要量入手するための方法の確立に寄与するであろう。また、口腔上皮細胞を入手できるようになれば、う蝕歯のエナメル質再生療法も可能になるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

[1] A. N. Abdullah, S. Miyauchi, A. Onishi, K. Tanimoto, K. Kato. Differentiation of mouse iPS cells into dental epithelial-like cells in the absence of added serum. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 55(2), 130-137 (2019)

〔学会発表〕(計12件)

[1] K. Kato: Engineering aspects of stem cell-based regenerative dentistry. FORIL XII (2019, Jakarta, Indonesia)

[2] K. Kato: Toward engineering organ regeneration. 5th Joint Scientific Meeting in Dentistry (2018, Surabaya, Indonesia)

[3] 加藤功一: バイオデータベースを活用した生体材料の創生. 日本バイオマテリアル学会・中四国ブロック第6回講演会 (2018, 岡山)

[4] A. Onishi, A. N. Abudullah, K. Tanimoto, K. Kato: The effect of epidermal growth factor on oral epithelial-like cell induction from mouse iPS cells. 5th TERMIS World Congress - 2018 (2018, Kyoto)

[5] Optimization of culture conditions for the efficient induction of dental epithelial cells from iPS cells: S. Miyauchi, A. N. Abdullah, K. Kato: 6th Japan-China Symposium on Nanomedicine (2018, Matsue)

[6] H. Watanabe, A. N. Abdullah, Y. Yamauchi, I. Hirata, K. Kato: Surface-immobilization of neurotrophin-4 mimetic peptide for the selective binding of a TrkB-expressing cell population from iPS cells. 6th Japan-China Symposium on Nanomedicine (2018, Matsue)

[7] 大西梓, Aimi N. Abdullah, 谷本幸太郎, 加藤功一: 人工多能性幹細胞をソースとした口腔上皮細胞様細胞作製の効率化. 第39回日本バイオマテリアル学会大会 (2017, 東京)

[8] 宮宇地聡史, Aimi N. Abdullah, 加藤功一: 人工多能性幹細胞から歯原性上皮細胞への分化に及ぼす培養法の影響. 第56回広島県歯科医学会・第101回広島大学歯学会 (2017, 広島)

[9] 渡辺陽久, 山内優佳, 平田伊佐雄, 加藤功一: TrkB 発現 iPS 細胞の選択的捕捉を目的とした neurotrophin 4 模倣ペプチドの表面固定. 歯科理工学会近畿・中四国支部地方会セミナー (2017, 大津)

[10] Miyauchi S, Abdullah AN, Nikawa H, Kato K: Optimization of culture conditions for the efficient differentiation of iPS cells into dental epithelial cells. International Dental Materials Congress 2016 (2016, Bali, Indonesia)

[11] Abdullah AN, Tanimoto K, Kato K: Induced pluripotent stem cells: A potential cell source for regenerative dentistry. International Dental Materials Congress 2016 (2016, Bali, Indonesia)

[12] Thanh Thanh PD , Abdullah AN, Kato K: Identification of surface markers of dental epithelial like cells derived from induced pluripotent stem cells. 日本歯科理工学会近畿・中四国支部地方会セミナー (2016, 大阪)

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 平田 伊佐雄

ローマ字氏名： Isao Hirata

所属研究機関名： 広島大学

部局名： 大学院医歯薬保健学研究科

職名： 助教

研究者番号 (8 桁): 40346507

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 谷本 幸太郎

ローマ字氏名： Kotaro Tanimoto