

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17310

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた高効率なエナメル芽細胞分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of highly efficient ameloblast differentiation induction method with human iPS cells

研究代表者

新垣 真紀子 (Arakaki, Makiko)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80610675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯は上皮-間葉の相互作用により複雑な形態形成が行われる。しかしながらエナメル芽細胞に関しては、詳細な分化メカニズムは解明されておらず、分化誘導の方法も確立されていない。我々は既にエナメル芽細胞の分化には、アメロラスチンやNT-4が重要であることを明らかにし、マウスiPS細胞をラット歯原性上皮細胞SF2を用いてエナメル芽細胞に分化させることに成功している。

本研究では、歯の再生医療の細胞供給源としてヒトiPS細胞からエナメル芽細胞への高効率分化誘導法の開発を行うことを目的とし、本研究期間にヒトiPS細胞とSF2を用いた培養方法により、歯原性上皮細胞様の形態分化とアメロラスチンの発現を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科領域においては、う蝕や歯周病、口腔領域外傷などの歯科疾患により損傷を生じた歯に対して、現在のところ人工材料を用いた修復方法が主に行われており、歯の細胞や組織再生を応用した治療技術は確立していない。ヒトの歯の再生に至っていない理由として、ヒトの顎骨に適した大きさや形態を有する人工歯胚を再構築するのに必要な歯原性細胞が確保出来ないこと、歯の発生メカニズムに関する分子レベルでの解明が十分でないことなどが挙げられる。従って、大量調整が可能で、倫理的問題をクリアし、免疫拒絶反応もないヒトiPS細胞を用いた歯関連細胞、中でもエナメル芽細胞への分化誘導法を確立することは将来的な歯の再生研究に有効である。

研究成果の概要(英文)：Tooth germs perform complex morphogenesis through the interaction of epithelial-mesenchymal cells. However, with respect to ameloblasts, the detailed differentiation mechanism has not been clarified, and the inducing differentiation method has not been established. We previously shown that ameloblastin (Ambn) and NT-4 are important for the differentiation of ameloblasts, and already succeeded to differentiate mouse iPS cells into ameloblasts using rat odontogenic epithelial cell SF2.

The purpose of this study is to establish a highly efficient method for inducing differentiation of human iPS cells to ameloblasts as a cell source for human tooth regeneration studies. We confirmed morphological changes from human iPS cells to odontogenic epithelial cell-like population and expression of ameloblastin.

研究分野：再生医療

キーワード：歯 再生 iPS細胞 エナメル芽細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、幹細胞研究の急速な発展により、神経や筋肉、骨など様々な細胞の分化誘導が可能となっている。一方で、歯科領域においては、齲蝕や歯周病などで損傷を生じた歯に対して、人工材料を用いた修復方法が主に行われ、現段階では組織再生を応用した治療方法の確立に至っていない。歯は上皮-間葉間の相互作用により、BMP や FGF、Shh など多くのシグナルを介して形態形成が行なわれる。また、歯は硬組織と軟組織から成る複合体構造であり、形態制御の複雑性と長期間を要することが歯胚再生のハードルとなっている。

(2) マウスでは器官原器法により歯胚再構築は可能となっている(Nakao K and Tsuji T *et al.* *Nat Methods*. 2007)が、胎児組織を利用する手法は倫理的な問題を残している。一方で、歯髄幹細胞も骨、神経、脂肪といった細胞に分化できる多分化能を有するが、歯髄中にはわずしか存在しないため、十分量確保することが困難である。そこで、多分化能と自己複製能をもつ人工多能性幹細胞 iPS 細胞が、再生医療の細胞源、また創薬開発ツールとして応用を期待されている。

(3) 歯関連細胞の中でも、エナメル芽細胞に関しては、未だ詳細な分化メカニズムは解明されておらず、多能性幹細胞をエナメル芽細胞へ分化誘導した報告はほとんどない。そこで我々は、iPS 細胞を用いたエナメル芽細胞の分化誘導技術の開発を試みている。我々の研究グループは、エナメル質形成に関する分子群の機能解析を行っており、歯原性上皮細胞からエナメル芽細胞への分化には、エナメル芽細胞が分泌するエナメル基質アムロプラスチン (Ambn) が重要な役割をもつことを明らかにしてきた(Fukumoto S *et al.* *J Cell Biol.* 2004)。

(4) 以前の研究で、マウス iPS 細胞と Ambn 遺伝子を発現するラット歯原性上皮細胞株 SF2 との共培養系による分化誘導を行い、培養 6 日目では iPS 細胞から上皮細胞様集団の分化を認め、培養 14 日目には抗 AMBN 抗体にて強い AMBN 発現と局在を確認した。また RT-PCR 解析にて、マウス由来外胚葉マーカー p63、上皮細胞マーカー CK14 ならびにエナメル芽細胞マーカー Ambn とエナメルリン (Enam) の発現と増加を確認した。このことより、我々は世界で初めて iPS 細胞をエナメル芽細胞に分化させることに成功したといえる (Arakaki M *et al.* *J Biol Chem.* 2012)。さらに、マウス iPS 細胞と SF2 の培養上清を用いた conditioned medium (CM) 培養系による分化誘導を試みて、同様に iPS 細胞をエナメル芽細胞に分化誘導できることを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

(1) iPS 細胞や他の多能性幹細胞が、将来的にヒトの歯科疾患治療、歯胚再生研究に応用可能な、低リスクで均一、大量調整可能な細胞供給源になりうることを期待される。従って本研究では、マウス iPS 細胞に替えて、ヒト iPS 細胞を用いた歯原性細胞、特にエナメル芽細胞の効率的な分化誘導法を確立し細胞純化することを主な目的とする。

(2) ヒト iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化メカニズムの解明を試みる。iPS 細胞からエナメル芽細胞の分化における誘導因子として、SF2 が分泌する AMBN や神経栄養因子 NT-4 が重要な役割を担っていることを明らかにしている。マウス iPS 細胞をエナメル芽細胞に分化誘導した際の mRNA 発現解析では、p63 や CK14 の発現上昇に続いて、Ambn や Enam の発現が開始していたため、多能性幹細胞から上皮細胞、エナメル芽細胞への各分化過程における遺伝子発現解析を行い、さらなる分化制御因子の同定を行なう。

(3) 適切な形態の歯を構築するためには、iPS 細胞から分化させた歯胚関連細胞を三次元的に再配列し、移植する技術開発が必要である。そのため、歯の形成を促進し、かつ人為的に歯の形態を制御できるキャリアー (担体) が必要と考えられる。従って、iPS 細胞由来歯原性細胞とキャリアーの相互作用による歯胚誘導能の評価を行なう。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト iPS 細胞培養方法の検討

本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4、c-Myc の 4 遺伝子導入して作製されたヒト iPS 細胞 (hGF-iPS-547A) をマウス SNL 細胞上で培養し、その後フィーダーフリー培養に移行し異種動物由来細胞の混入を最小限に抑えて分化誘導を行なう。さらに iPS 細胞を、凝集させて胚様体 Embryoid bodies (EBs) を形成した後に分化誘導する方法も検討する。ヒト iPS 細胞の多分化能は、RT-PCR 法および細胞免疫染色法を用いて未分化・多能性マーカーの発現を確認する。

#### (2) ヒト iPS 細胞のエナメル芽細胞への分化効率の検討

iPS 細胞から上皮前駆細胞へ分化制御し、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を期待する。本研究ではヒト iPS 細胞から胚様体 EBs を形成した後、角化細胞培地 (K-SFM) で培養し、さらに型 collagen コート上で BMP4 コンパウンドを添加した K-SFM で培

養することで p63 および CK14 陽性の上皮前駆細胞へと誘導する。加えて、未分化ヒト iPS 細胞もしくは上皮前駆細胞へ誘導したヒト iPS 細胞を、SF2 の CM 培養系を用いて歯原性上皮細胞やエナメル芽細胞に分化誘導を試みる。その際、CM 条件および NT-4 刺激などによる効率的な分化誘導法を検討する。

### (3) マイクロアレイ解析

ヒト iPS 細胞由来のエナメル芽細胞を単離し、cDNA マイクロアレイ法でエナメル芽細胞への分化過程における遺伝子発現変化を解析する。分化に伴い発現が変化する遺伝子のうち、特に転写因子に着目して網羅的に探索し、同定された因子の強制発現や siRNA ノックダウン法により機能解析を行なう。そこから得た結果を元にエナメル芽細胞分化メカニズムの解明につなげ、エナメル芽細胞分化因子を特定し応用することで、ヒト iPS 細胞を用いたエナメル芽細胞の効率的な分化誘導法を確立する。

### (4) ヒト iPS 細胞由来歯原性細胞と人工合成リン酸オクタカルシウム (OCP) との相互作用評価

将来的な人工歯胚構築のキャリアーとして検討している、人工合成リン酸オクタカルシウム (OCP) との相互作用による、エナメル基質や象牙質基質等の発現について解析を行う。ヒト iPS 細胞から分化誘導した歯原性上皮細胞ならびに間葉細胞を OCP コートした培養ディッシュ上で培養し、Ambn、Enam、アメロジェニン (Amel) 等の基質分泌について、RT-PCR 法、western blot 法にて解析を行う。将来的には、歯胚形態に類似させた OCP コラーゲン薄膜上に、上部にはヒト iPS 細胞由来エナメル芽細胞、下部にはヒト iPS 細胞由来歯原性間葉細胞を培養し、免疫不全マウス腎被膜下への移植実験を行う。この際、移植歯胚の形成速度、形態評価、エナメル質・象牙質の結晶性など歯胚誘導能について評価する。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導法の検討

我々のこれまでの研究ではマウス iPS 細胞を培養する際に、フィーダー細胞である胚性線維芽細胞 (MEF) 上で未分化状態を維持した iPS 細胞をエナメル芽細胞への分化誘導に用いてきた。本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4、c-Myc の 4 遺伝子導入して作製されたヒト iPS 細胞 (hGF-iPS-547A) をマウス SNL 細胞上で維持したものをを用いた。ヒト iPS 細胞はマウス iPS 細胞と異なり平坦なコロニーを形成するが、コロニー形態や増殖スピードが変化しないよう継代を行い、第 3 継代までのヒト iPS 細胞をエナメル芽細胞の分化誘導に用いた。以前の研究では、マウス iPS 細胞と、Ambn 遺伝子発現するラット歯原性上皮細胞株 SF2 との共培養系による分化誘導を行い、培養 6 日目にマウス iPS 細胞塊周辺から上皮細胞様集団の分化を認め、培養 14 日目には抗 AMBN 抗体にて強い AMBN 発現を伴うマウス iPS 細胞の局在を確認している。また RT-PCR 解析にて、マウス由来外胚葉マーカー p63、上皮細胞マーカー CK14 ならびにエナメル芽細胞マーカー Ambn とエナメルリン (Enam) の発現と増加を確認している。本研究でも同様に、ヒト iPS 細胞をマイトマイシン C 処理したラット歯原性上皮細胞 SF2 上で共培養したところ、培養 7 日目にヒト iPS 細胞塊周辺から上皮細胞様集団の形態分化を認め、培養 14 日目には RT-PCR 法でヒト iPS 細胞由来 Ambn の発現が確認された。その際、未分化マーカーに関しても発現を確認した。また、ヒト iPS 細胞由来の歯原性細胞の将来的な歯科再生領域への応用を考慮して、異種動物由来細胞の混入を最小限にするため、SF2 の培養上清を用いた conditioned medium (CM) 培養系による分化誘導を試みた。結果、CM の場合も同様に、ヒト iPS 細胞を歯原性上皮細胞あるいはエナメル芽細胞に分化誘導できることが明らかになった。

### (2) ヒト iPS 細胞培養方法の検討

異種動物由来細胞の混入を最小限に抑えて分化誘導を行なうため、ヒト iPS 細胞のフィーダーフリー培養に移行し、iPS 細胞を凝集させて胚様体 Embryoid bodies (EBs) を形成した後に分化誘導する方法を検討した。iPS 細胞は多分化能を有するため、上皮前駆細胞へ分化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効率的に分化誘導できることが期待される。本研究では、ヒト iPS 細胞に先立って、マウス iPS 細胞で行ったところ、型 collagen コート上でのフィーダーフリーならびに EBs 培養するも、CM 培養に移行すると培養 1 週間程度で明らかに生育が進まない状態となった。さらに、これまでの iPS 細胞研究から、マウス iPS 細胞と異なり、ヒト iPS 細胞はその樹立効率が低いことに加えて、分化誘導効率も低くなることが明らかとなっている。ヒトの歯の再生研究においては、分化誘導して得られるガン化のリスクのない、均一で純度の高い細胞が鍵となるため、ヒト iPS 細胞におけるフィーダーフリー培養および CM 培養によるエナメル芽細胞への分化誘導は今後の課題としている。

### (3) エナメル芽細胞分化誘導因子の同定と応用

マウス iPS 細胞を用いた予備実験において、iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化過程における誘導因子として、SF2 が分泌する AMBN と神経栄養因子の 1 つである NT-4 に着目し、Ambn 低発現の SF2-7 に Ambn 遺伝子を過剰発現させた時、また、Ambn 高発現の SF2-24 の CM に抗 NT-4 抗体を加えた時のエナメル芽細胞への分化を評価した。その結果、Ambn 高発現 SF 株との共培養

や Ambn 過剰発現させた時に iPS 細胞由来 Ambn の発現が強く確認された。また、Ambn 高発現の SF2-24 の CM に抗 NT-4 抗体を加えた時には、iPS 細胞由来 Ambn の発現が減少した。従って、iPS 細胞からエナメル芽細胞の分化には、アメロプラスチンや NT-4 が重要な役割を担っていることが明らかとなっている。また、本研究期間において、ヒト iPS 細胞とラット歯原性上皮細胞 SF2 との共培養に、SF2 の CM 培養も組み合わせることで、以前よりも高効率にエナメル芽細胞に分化させることに成功している。一方、SF2 の培養上清の存在のみでも iPS 細胞からエナメル芽細胞へ分化誘導可能であることから、今後は、培養上清に含まれる誘導因子も探索する予定である。限外ろ過法や超遠心分析にて培養上清に含まれるタンパク質を分離・精製し、分化に関わると推測される因子のさらなる同定を行うこととしている。本研究期間には至らなかったが、最終的にヒト iPS 細胞由来のエナメル芽細胞を、セルソーティングを用いて単離し、cDNA マイクロアレイ法でエナメル芽細胞への分化過程における遺伝子発現変化を解析する。分化に伴い発現が変化する遺伝子のうち、特に転写因子に着目して網羅的に探索し、同定された因子の強制発現や siRNA ノックダウン法により機能解析を行なう。これによりエナメル芽細胞分化メカニズムの解明につながることを期待される。

本研究により、ヒト iPS 細胞から分化誘導された歯原性上皮細胞あるいはエナメル芽細胞が、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にも貢献することが期待された。さらに、歯と同様、上皮間葉相互作用による初期発生を示す腺組織や肺、毛胞、腎臓など他の外胚葉由来器官の発生の理解にもつながる意義のある研究であり、本研究期間終了後もさらなる解析を行うこととしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kim EJ, Yoon KS, Arakaki M, Otsu K, Fukumoto S, Harada H, Green DW, Lee JM, Jung HS.	4. 巻 Jan;248(1)
2. 論文標題 Effective Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Into Dental Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev Dyn	6. 最初と最後の頁 129-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.24663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirayama K, Hanada T, Hino R, Saito K, Kobayashi M, Arakaki M, Fukumoto S, Yamada A.	4. 巻 Volume 28, (2)
2. 論文標題 Material properties on enamel and fissure of surface pre-reacted glass-ionomer filler-containing dental sealant.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ped dent J	6. 最初と最後の頁 87-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1016/j.pdj.2018.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima H, Shimizu K, Watahiki A, Hoshikawa S, Kosho T, Oba D, Sakano S, Arakaki M	4. 巻 Nov 16;68(4)
2. 論文標題 NOTCH2 Hajdu-Cheney Mutations Escape SCFFBW7-Dependent Proteolysis to Promote Osteoporosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Cell	6. 最初と最後の頁 645-658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2017.10.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----