

平成21年6月10日現在

研究種目：基盤研究 (C) (一般)

研究期間：2006～2008

課題番号：84420

研究課題名 (和文)

アクチビンAによるマウスES細胞からの顎骨ならびに歯胚の誘導

研究課題名 (英文) Induction of mandibular bone and tooth germ from mouse embryonic stem cells by activin A

研究代表者

古江 美保 (Furue Kusuda Miho)

独立行政法人・医薬基盤研究所 生物資源研究部 細胞資源研究室・研究員

研究者番号：80257319

研究成果の概要：歯ならびに顎骨の再生は、再生医学研究の分野において21世紀の課題の1つである。その再生のソースには胚性未分化 (ES) 細胞があげられる。ES細胞はその多能性と自己複製能を兼ね備えた万能細胞として注目されているが、その分化をコントロールすることはとても難しい。本研究では、歯ならびに顎骨の由来組織である神経堤細胞の発生に関する因子を明確にし、マウスES細胞からの効率的な神経堤細胞の分化誘導法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,700,000	0	1,700,000
19年度	1,100,000	330,000	1,430,000
20年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 形態系基礎歯科学

キーワード：ES細胞、再生、発生、神経堤、LIF、FGF、無血清培養、分化

1. 研究開始当初の背景

歯ならびに顎骨の再生は、口腔領域のみならず再生医学研究の分野において21世紀の課題の1つである。その再生のソースには、胚性未分化 (ES) 細胞や組織幹細胞があげられる。特に、ES細胞は、その多能性と自己複製能を兼ね備えた万能細胞として注目され、様々な組織への分化制御の研究が進められている。ES細胞は万能ゆえに、自発的に様々な細胞に分化し、現段階ではその分化をコントロールすることはとても難しい。従って、これまで発生学の分野で積み重ねられた基礎研究をさらに発展させ、未分化細胞からの歯胚形成や顎骨誘導における分子メカニズムを詳細に解明し、in vitro 及び in vivo

での誘導法を確立する必要がある。

1989年に浅島らによりアクチビンAの中胚葉誘導活性が明らかにされてから、分化誘導因子として認識されている。アクチビンAはその濃度によりアフリカツメガエル胚・予定外胚葉領域未分化細胞から筋肉、神経、眼、腎臓、脾臓、腸など、中胚葉組織だけでなく内胚葉器官も誘導することができる (Furue, M., and Asashima, M. Handbook of stem cells: Lanza, R., Ed. Vol. 1 Embryonic Stem Cells. 46. P. 483-492. Academic Press, San Diego 2004)。このような器官形成や再生におけるプログラムは、脊椎動物の発生過程において、種を越えて保存されていることが明らかにされつつある。そこで、脊椎動物における口腔諸器官の発生のプログラムを明ら

かにするために、アフリカツメガエルを実験モデルとして、平成 13~14 年度に研究をおこなった結果、アフリカツメガエル胚・予定外胚葉領域未分化細胞からアクチビン A により試験管内で下顎の誘導に成功した(Furue, M., et al. PNAS. USA, 99, 15474-15479, 2002)。この成果を発展させ、平成 15 年~16 年度に研究を行った結果、解離させたアフリカツメガエル胚・予定外胚葉領域未分化細胞からアクチビン A と再集合培養法を用いることにより、試験管内において神経堤を誘導し、それを幼生腹部に移植し、歯を誘導することに成功した(Myoishi, Y. et al. Int J Dev Biol 48: 1105-1112, 2004)。さらに、その成果を哺乳類に発展させるために、マウス ES 細胞のフィーダー細胞を用いず長期間未分化性を高率に維持できる無血清培養法を開発した(Furue M, et al. In Vitro Cell & Dev Biol Animal. 41:19-28, 2005)。以上の結果から、マウス ES 細胞を用いて、顎骨ならびに歯が誘導できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

- 1) アフリカツメガエルにおいて明らかにされているような初期発生におけるアクチビン A による組織分化誘導ならびに体軸形成プログラムを、マウス ES 細胞培養系で再現できる条件を開発する。
- 2) マウス ES 細胞から試験管内において、神経堤の位置情報をもつ細胞を誘導する条件を開発する。
- 3) 神経堤から顎骨ならびに歯胚を誘導する方法を検討し、マウス ES 細胞からの顎骨ならびに歯の発生プログラムを明らかにする。

3. 研究の方法

両生類で明らかにされているような初期発生における組織分化誘導プログラムを、マウス ES 細胞培養系で再現できる基礎条件を検討した。

(1) 接着因子による分化誘導

これまでの申請者らの研究ならびに準備で、2次元培養系において分化を誘導するためには、適正な接着因子が必要であることを示唆する結果を得た。そこで、2次元培養系における接着因子による未分化マーカーならびに初期分化誘導遺伝子の変動を real time RT-PCR により測定した。

[方法]

I 型ならびにIV型コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ファイブロネクチン、ビトロネクチン、ポリDリシンをコートしたディッシュに、ES 細胞を播種し、培養を4日間行った。

① 未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を測定した。

② 未分化マーカーOct3/4, nanog, Sox2, 原始外胚葉マーカー・FGF-5, 内胚葉分化マーカーGATA4, 6 の遺伝子発現量を測定した。

(2) ES 細胞における各種増殖因子による遺伝子発現量変動の測定した。

アフリカツメガエルアニマルキャップにおいては、アクチビン A による濃度依存的な中胚葉やオーガナイザー遺伝子発現が起こる。そこでマウス ES 細胞2次元培養系における各種増殖因子による初期分化マーカー遺伝子の発現を real time RT-PCR により測定した。

(1) の結果で、*FGF-5* をもっとも高く発現する接着因子をコートしたディッシュに ES 細胞を播種し、各種増殖因子を添加して培養を行って、遺伝子発現のリアルタイム PCR を用いて解析を行った。

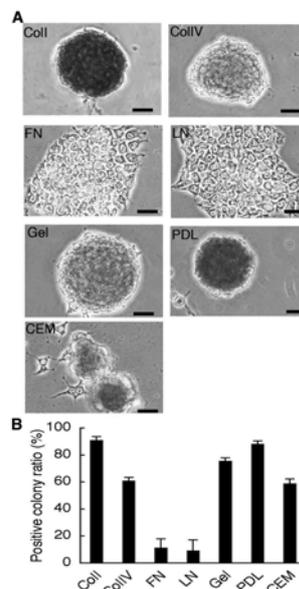
4. 研究成果

神経堤細胞は、脊椎動物の胚で表皮外胚葉と神経外胚葉の境界部に形成され、顎骨、歯、末梢神経、筋肉など種々の細胞へ分化する。その分化多様性から再生医療用の細胞供給源として期待されているが、生体から採取できる細胞は少量で、分化メカニズムは十分に解明されていない。これまでの研究により、アフリカツメガエルのアニマルキャップとアクチビンを用いて、顎骨や歯胚の誘導に成功した。マウス胚性幹(ES)細胞は、その多能性と自己複製能から再生医療や分化の研究に用いられており、ES 細胞から神経堤細胞の分化誘導法の開発は多量の神経堤細胞の供給を可能にすると期待される。アフリカツ

メガエルにおける成果をもとに、マウス ES 細胞からの歯胚や顎骨の誘導を目的として、本研究を行った。

マウス ES 細胞のフィーダー細胞を用いない無血清培地を用いて、未分化性を維持する条件を確立した。その際に、マウス ES-D3 細胞の未分化性維持に、細胞

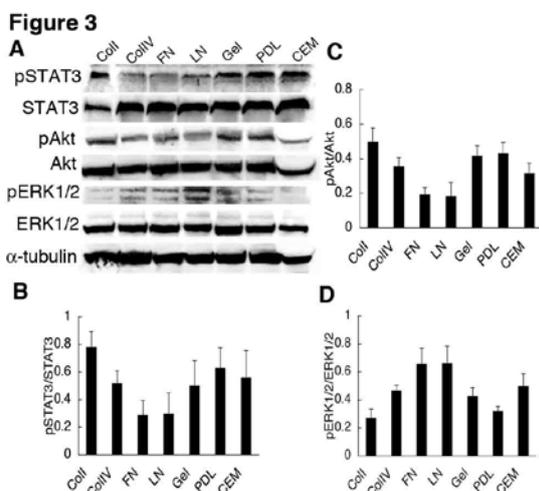
図 1. 論文④の Figure 6 より



外マトリックス (ECM) が関与していることが明らかとなった (図1)。すなわち、我々が確立したフィーダー細胞を用いない無血清培養条件 ESF7 を用いた実験系においては、コラーゲンは、ES細胞の未分化性を維持するために、LIFのシグナルを伝達する。一方、ラミニンやファイブロネクチンは、LIFのシグナルと、分化誘導の方向へと、伝達する (図2)。

これらの結果から、分化誘導のためには、ラミニンやファイブロネクチンが有用であ

図2、論文⑥の Figure3 より抜粋
マウス ES 細胞における LIF の未分化維持シグナルに与える影響

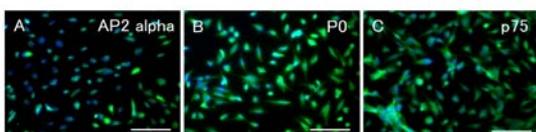


ることが明らかとなり、その成果を論文発表した (Hayashi, Y., et al. *Stem Cells*. 25:3005-15. 2007)。

そこで、ラミニンならびにファイブロネクチンを用いて、分化誘導を試みた。無血清培養条件下に BMP4 を添加すると、原始外胚葉には分化しない。一方、FGF-2 を添加して、培養を行うことにより、原始外胚葉を経て、神経上皮細胞に分化誘導されることがわかった。さらに、FGF-2 と種々の増殖因子を併用して添加することにより、神経堤幹細胞に誘導できることがわかった。誘導された細胞は P0, P75, Twist 等多くの神経堤細胞マーカーの発現量が増加した (図3)。

以上のように、無血清二次元培養下に、マウス ES 細胞から神経堤細胞への分化誘導条件を確立した。

図3. マウス ES 細胞から誘導した細胞における AP-2, P0, P75 の発現



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 8 件)

① Mio Nakanishi, Akira Kurisaki, Yohei Hayashi, Masaki Warashina, Shoichi Ishiura, Miho Kusuda-Furue, and Makoto Asashima, Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:114-22. (2009)、査読有

② Miho K. Furue, Jie Na, Jamie P Jackson, Tetsuji Okamoto, Mark Jones, Duncan Baker, Ryu-Ichiro Hata, Harry D. Moore, J. Denry Sato, Peter W. Andrews, Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:13409-14 (2008) 査読有

③ 古江-楠田 美保、日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化 その 1、*Tissue culture research communications* 27:139-147 (2008) 査読有

④ 林 洋平, 古江-楠田 美保, 明石 靖史, 岡本 哲治, 浅島 誠、マウス ES 細胞の無血清培養法 *Tissue culture research communications*, 27: 107-115 (2008) 査読有

⑤ 古江-楠田 美保、特集「ヒト ES 細胞による再生医療」臨床用ヒト ES 細胞株作成における課題 *メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 33: 1251-1254 (2007)

⑥ Yohei Hayashi, Miho Kusuda Furue, Tetsuji Okamoto, Kiyoshi, Ohnuma, Yasufumi Myoishi, Yasuaki Fukuhara, Takanori Abe, J. Denry, Sato, Ryu-Ichiro Hata, Makoto Asashima, Integrins Regulate Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. Stem Cells*. 25:3005-15. (2007) 査読有

⑦ Nagamine, K., Furue, M., Fukui, A., Matsuda, A., Hori, T., and Asashima, M. Blood cell and vessel formation following transplantation of activin-treated explants in *Xenopus*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 30:1856-9. (2007) 査読有

⑧ Sato JD, Hayashi Y, Furue M, Ohnuma K, Myoishi Y, Abe T, Hata RI, Okamoto T, and Asashima M. Integrin regulation of mouse

embryonic stem cell self-renewal.
In vitro Cell. & Dev. Biol.-Anim. 42,
29A-29A Suppl. (2006) 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 古江一楠田美保、彩都・医薬基盤研連携フォーラム、創薬開発ツールとしてのヒト ES 細胞培養法 平成 20 年 12 月 4 日 大阪
- ② 古江一楠田 美保 第 15 回 組織工学・再生医学ワークショップ ～企業化を目指す再生医療～ 「ヒト ES 細胞培養法 - 創薬開発ツールとしての利用を目指して-」 平成 20 年 9 月 (大阪)
- ③ 古江一楠田 美保、第 70 回 彩都バイオサイエンスセミナー、ヒト ES 細胞培養用の完全合成培地開発を目指して、2008 年 6 月 (大阪)
- ④ 古江一楠田 美保、平成 20 年度日本歯科大学歯学会総会 シンポジウム「歯の再生：戦略、現状、予測」ES 細胞からの顎骨の再生 平成 20 年 6 月 7 日 (東京)
- ⑤ 古江一楠田 美保、JAACT 総会・第 19 回 動物細胞工学シンポジウム 「マウス、ヒト ES 細胞の無血清培養」平成 20 年 6 月 (東京)
- ⑥ 古江一楠田 美保、日本組織培養学会 シンポジウム 「先端医療を支える細胞培養技術の現状と将来への課題」 ヒト胚性幹細胞培養の現状と国際標準化平成 20 年 5 月 (筑波)
- ⑦ 古江一楠田 美保、歯周病学会 若手研究者の集い、マウス、ヒト ES 細胞の無血清培地開発 平成 20 年 10 月 (三重)
- ⑧ 古江 美保、第 61 回日本口腔科学会学術集会、シンポジウム 口腔領域の stem cell biology、胚性未分化細胞からの歯胚ならびに顎骨誘導の可能性 2007 年 4 月 (神戸)
- ⑨ 古江 美保、The Centre for Stem Cell Biology 2006 International Symposium 2006 年 7 月 (シェフィールド、英国) "Human Embryonic Stem Cells - Progress Towards Cell Therapy" "Development of Defined Medium for Human ES Cell Culture."
- ⑩ 古江美保、日本組織培養学会第 79 回大会・学会創立 50 周年記念国際シンポジウム "Frontiers in Human ES Cell Research" "Neuroectodermal differentiation from embryonic stem cells in Xenopus, Mouse, and Human" 2006 年 5 月 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古江 美保 (Furue Kusuda Miho)

独立行政法人・医薬基盤研究所・生物資源研究部・細胞資源研究室・研究員

研究者番号：80257310

(3) 連携研究者

畑 隆一郎 (Hata Ryuichiro)
神奈川歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：10014276