

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09511

研究課題名(和文) 神経堤由来細胞とiPS細胞による歯原性細胞不在のエナメル芽細胞と象牙芽細胞誘導法

研究課題名(英文) Establishment of induction method from iPS cells to odontogenic cells

研究代表者

須澤 徹夫 (Suzawa, Tetsuo)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：60271285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞から、歯原性上皮細胞あるいは歯原性間葉細胞へ誘導する技法を検討した。1) iPS細胞からEGFとFGF-2によって神経堤由来細胞へ、さらにBMP-2などの刺激によって象牙芽細胞様細胞へ誘導した。この誘導でDSPPとRUNX2遺伝子の発現上昇が認められた。2) iPS細胞からレチノイン酸とBMP-4によってケラチノサイトへ、さらにFGF-8とShhの刺激によってエナメル芽細胞様細胞へ誘導した。この誘導でアメロブラスチンなどの発現上昇が認められた。これらの誘導した歯原性細胞の上皮 間葉相互作用を利用して、歯胚の形成過程を模倣した歯の再生に取り組む。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞から歯原性細胞のサポート無しにエナメル芽細胞へ誘導することは、不明な点が多いエナメル芽細胞分化を解き明かす一助になる。iPS細胞から誘導した歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞の上皮 間葉相互作用による歯原性細胞に依存しない歯胚形成は、歯を失った高齢者などに対応できる歯胚再生法として有望と考える。

研究成果の概要(英文)：We investigated techniques for inducing iPS cells to dental epithelial cells or dental mesenchymal cells. 1) iPS cells were induced into neural crest-derived cells by EGF and FGF-2, and then into odontoblast-like cells by BMP-2. These inductions increased the gene expression of DSPP and RUNX2. 2) iPS cells were induced into keratinocytes by retinoic acid and BMP-4, and then into ameloblast-like cells by FGF-8 and Shh. These inductions increased the gene expression of AMBN and AMELX. These results demonstrated that iPS cells could be guided differentiation toward odontogenic lineage via regulating the signaling of tooth development, without odontogenic cells.

研究分野：口腔生化学

キーワード：iPS細胞 エナメル芽細胞 象牙芽細胞 神経堤由来細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を反映し平均寿命の延びに伴う喪失歯の増加は、QOL 低下につながるため改善が求められる。近年進展する再生医学は歯科分野においても、胎生期歯原性細胞を用いた歯胚の再生や、iPS 細胞(induced pluripotent stem cells;人工多能性幹細胞)による歯胚構成細胞誘導などの研究成果から喪失歯への歯胚再生医療が期待される。一方で臨床応用となると、現状の研究の多くは歯原性細胞(歯の形成に関わる細胞)を直接的、あるいは間接的に細胞ソースとして利用することから、すでに歯が無くなった高齢者などへの対応には課題が残る。

歯の形成は上皮の肥厚に始まり、直下の間葉組織に神経堤由来細胞が凝集し、上皮が間葉側へ陥入して生じたエナメル器が間葉組織を囲み歯乳頭に、周囲間葉が増殖して歯小嚢となる。歯乳頭の一部は象牙芽細胞へ分化して象牙質を、歯乳頭に接する上皮細胞はエナメル芽細胞へ分化してエナメル質を形成する。歯胚形成は、歯原性上皮と間葉細胞の相互作用で進行する。iPS 細胞は、体細胞に特定 4 遺伝子を導入して様々な細胞への分化できる多能性幹細胞である。その iPS 細胞を神経堤細胞へ誘導後に歯胚上皮細胞の培養上清を培地に加えて、象牙芽細胞を含む歯原性間葉へ誘導(Otsu K, *Stem Cells Dev* 21:p1156, 2012)の論文や、マウス iPS 細胞を浮遊培養後に BMP4 を加えて象牙芽細胞へ誘導(Ozeki N, *PLoS One* 8:e80026, 2013)や、マウス iPS 細胞から神経堤様細胞に分化後 Pax9 の遺伝子導入や BMP4 添加で象牙芽細胞へ誘導(Seki D, *Stem Cells Transl Med* 4:p993, 2015)の報告がある。エナメル芽細胞では、iPS 細胞と歯原性上皮細胞の共存培養による誘導や (Arakaki M, *J Biol Chem* 287:p10590, 2012)、エナメル芽細胞培養上清がマウス iPS 細胞をエナメル芽細胞へ誘導した (Liu L, *J Tissue Eng Regen Med* 10:p466, 2016)論文があるが、共に歯原性上皮細胞がエナメル芽細胞誘導に必要である。

歯原性細胞に依存しない iPS 細胞から象牙芽細胞への誘導はすでに報告がある。しかし、歯原性細胞に依存しない iPS 細胞からエナメル芽細胞への誘導はこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

iPS 細胞から歯原性細胞のサポート無しにエナメル芽細胞へ誘導する技法を確立する。iPS 細胞から誘導したエナメル芽細胞と象牙芽細胞を用いて、生体内で細胞間相互作用によって進行する歯胚形成を模倣した、歯原性細胞に依存しない歯胚再生を実現化する。

3. 研究の方法

(1) 象牙芽細胞誘導

ヒト iPS 細胞を Essential 8 で増殖後に、DMEM/F-12 培地に bFGF と EGF 含有の誘導培地で神経堤由来細胞へ誘導した。神経堤由来細胞への分化は、指標の一つである SOX10 の発現によって評価した。続いて α MEM に 20% FBS、BMP-2、 β -グリセロリン酸、デキサメタゾン、リン酸二水素カリウム含有培地で象牙芽細胞へ誘導した。細胞分化は象牙質シアロリンタンパク質(Dentin sialophosphoprotein: DSPP)と RUNX2 の遺伝子発現から評価した(TaqMan Real Time PCR Assays, Applied Biosystems)。またアリザリンレッド染色によって、細胞の石灰化能を評価した。

(2) エナメル芽細胞誘導

ヒト iPS 細胞を Essential 8 で増殖後に、MCDB154 培地に BMP-4 とレチノイン酸を加えた培地で培養してケラチノサイトへ誘導する。ケラチノサイトへの分化は、指標の一つである Cytokeratin 14 の発現によって評価した。続いて MCDB153 に下垂体エキス、インスリンなど添加した分化誘導培地で培養した。さらに必要に応じて培地に Shh や FGF8 などに加え、誘導条件の最適化を図った。細胞分化は、Amelogenin、Ameloblastin、KLK4 などの遺伝子発現を指標に評価した。また Western Blotting 法によって Amelogenin のタンパク質発現を解析した(Anti-AMELX antibody ab153915, abcam)。

(3) 上皮-間葉相互作用の解析

iPS 細胞から誘導したエナメル芽細胞様細胞と象牙芽細胞様細胞を接触させるようにコラーゲンゲル内(Cellmatrix Type I-A, Nitta Gelatin)で三次元培養して、上皮-間葉相互作用を利用した細胞の再構成を図った。スフェロイド状になった再構成細胞をマウス腎皮膜へ移植して、さらに成長した組織を Hematoxylin-Eosin 染色と Amelogenin の免疫組織染色を施して観察した。

4. 研究成果

(1) 象牙芽細胞誘導

ヒト iPS 細胞から EGF と FGF-2 によって神経堤由来細胞へ誘導した後に、BMP-2 やアスコルビン酸などの刺激によって象牙芽細胞様細胞へ誘導した。bFGF と EGF 含有の DMEM/F-12 培地で上昇した SOX10 の発現は、BMP-2 を含む誘導培地によって低下して、紡錘形の線維芽細胞様の細胞形態をとった。これらの誘導によって DSPP と RUNX2 遺伝子の発現上昇が認められたことから、象牙芽細胞様細胞へ分化したと考えられる。さらに培養経過に伴って、アリザリンレッド染色陽性の範囲が拡大した。

(2) エナメル芽細胞誘導

ヒト iPS 細胞からレチノイン酸と BMP-4 によって Cytokeratin 14 陽性のケラチノサイトへ誘導した後に、MCDB153 に下垂体エキス、インスリンなど添加した分化誘導培地によってエナメル芽細胞へ誘導した。レチノイン酸と BMP-4 によって、iPS 細胞は敷石状の上皮様の細胞形態を示した。MCDB153 を基本とする誘導培地に Shh と FGF8 を添加すると Amelogenin と Ameloblastin の遺伝子発現はさらに上昇した。一方で、Cytokeratin 14 とタンパク質分解酵素である KLK4 の発現は培養経過に伴って減少した。タンパク質の発現レベルでは、Shh と FGF8 による Amelogenin の誘導は認められなかった。

(3) 上皮-間葉相互作用の解析

iPS 細胞から誘導したエナメル芽細胞様細胞と象牙芽細胞様細胞を接触させるようにコラーゲンゲル内に包埋して、上皮-間葉相互作用を利用した歯胚再構成培養を実施した。コラーゲンゲルに包埋したエナメル芽細胞様細胞と象牙芽細胞様細胞は、培養経過に伴い一塊になってスフェロイド状を呈した。続いて再構成したスフェロイドをマウス腎皮膜へ移植して、成長したスフェロイド状の細胞を組織形態学的に解析した。エナメル芽細胞様細胞と象牙芽細胞様細胞に誘導した二種類の細胞は、上皮系あるいは間葉の特徴をもつ細胞形態を示した。一方で、それらの細胞が接する境界において明瞭な細胞の極性や、免疫組織染色によって Amelogenin が染色される範囲は観察されなかった。

個々の細胞の分化誘導では歯原性細胞特有の遺伝子発現が認められたが、エナメル芽細胞誘導においてタンパク質の発現レベルまで至らなかった。誘導期間の中で Shh と FGF8 で刺激するタイミングを変える、あるいはその他の成長因子を追加した誘導など、さらなる効率的な誘導法の探索が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Hiroshi, Suzawa Tetsuo, Shibata Yo, Takahashi Masahiro, Kawai Ryota, Takami Masamichi, Maki Koutaro, Kamiyo Ryutarō	4. 巻 554
2. 論文標題 Neural crest-derived cells in nasal conchae of adult mice contribute to bone regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 173 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.079	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 Takimoto Reiko, Suzawa Tetsuo, Yamada Atsushi, Sasa Kiyohito, Miyamoto Yoichi, Yoshimura Kentaro, Sasama Yuji, Tanaka Motohiro, Kinoshita Mitsuhiro, Ikezaki Kaori, Ichikawa Makoto, Yamamoto Matsuo, Shirota Tatsuo, Kamiyo Ryutarō	4. 巻 162
2. 論文標題 Zoledronate promotes inflammatory cytokine expression in human CD14 positive monocytes among peripheral mononuclear cells in the presence of T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 306 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imm.13283	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 Izumida E, Suzawa T, Miyamoto Y, Yamada A, Takimoto R, Otsu M, Saito T, Yamaguchi T, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Yoshimura K, Sasa K, Takimoto R, Uyama R, Shirota T, Maki K, Kamiyo R.	4. 巻 99
2. 論文標題 Functional analysis of PTH1R variants found in primary failure of eruption.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 429-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520901731	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 Kurotaki, Y., Sakai, N., Miyazaki, T., Hosonuma, M., Sato, Y., Karakawa, A., Chatani, M., Myers, M., Suzawa, T., Negishi-Koga, T., Kamiyo, R., Miyazaki, A., Maruoka, Y., Takami, M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of lipid metabolism on mouse incisor dentinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61978-0.	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 Matsumoto A, Takami M, Urano E, Nakamachi T, Yoshimura K, Yamada A, Suzawa T, Miyamoto Y, Baba K, Kamijo R.	4. 巻 62
2. 論文標題 Lipopolysaccharide (LPS) Inhibits Ectopic Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 and TGF- β 1 through IL-1 Production.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 44-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.01.004.	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 Suzawa Tetsuo, Yoshida Hiroshi, Takahashi Masahiro, Itose Masakatsu, Takimoto Reiko, Sasama Yuji, Tanaka Motohiro, Ikezaki Kaori, Shirora Tatsuo, Maki Koutaro, Kamijo Ruytaro	4. 巻 17
2. 論文標題 Prospects of neural crest derived cells from oral and dentofacial tissues for application in regenerative medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 115 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1064	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 須澤徹夫、笹清人、吉村健太郎、山田篤、宇山理紗、宮本洋一、上條竜太郎	4. 巻 52
2. 論文標題 神経堤由来細胞：再生医療の自家細胞ソースとしての可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 203 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧本 玲子、田中 元博、山田 篤、宮本 洋一、笹 清人、須澤 徹夫、吉村 健太郎、高見 正道、上條 竜太郎
2. 発表標題 ゾレドロン酸による末梢血単球の破骨細胞分化抑制
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧本 玲子、田中 元博、笹 清人、山田 篤、宮本 洋一、須澤 徹夫、吉村 健太郎、代田 達夫、上條 竜太郎
2. 発表標題 ゾレドロン酸はヒト末梢血単球の破骨細胞分化を抑制する
3. 学会等名 第18回東京骨関節フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒滝優太郎、坂井信裕、宮崎拓郎、細沼雅弘、佐藤ゆり絵、唐川亜希子、茶谷昌宏、マイヤース三恵、須澤徹夫、根岸(古賀)貴子、上條竜太郎、宮崎章、高見正道、丸岡靖史
2. 発表標題 脂質異常症モデルマウスは切歯の象牙質肥厚を伴う歯髄狭窄を呈する
3. 学会等名 第66回昭和大学学士会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉田恵理、須澤徹夫、山口徹太郎、宮本洋一、上條竜太郎、槇 宏太郎
2. 発表標題 原発性萌出不全特異的iPS細胞を用いた同疾患発症機序の解明
3. 学会等名 第29回 日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧本 玲子、宮本 洋一、山田 篤、須澤 徹夫、笹 清人、上條 竜太郎、代田 達夫
2. 発表標題 ビスホスホネートのヒト末梢血単核細胞に対する作用の解析
3. 学会等名 第65回昭和学士会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須澤徹夫, 糸瀬昌克, 稲垣克記, 上條竜太郎
2. 発表標題 脂肪組織由来再生細胞を応用した膝関節半月板治療法の開発
3. 学会等名 第55回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田寛, 須澤徹夫, 高橋正皓, 上條竜太郎, 槇宏太郎
2. 発表標題 鼻甲介に含まれる神経堤由来細胞の骨誘導を応用した骨移植への検討
3. 学会等名 第42回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧本玲子, 宮本洋一, 山田 篤, 須澤徹夫, 笹 清人, 上條竜太郎, 代田達夫
2. 発表標題 ビスホスホネートのヒト末梢血単核球に対する作用の解析
3. 学会等名 第65回昭和大学学士会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉崎リサ, 宮本洋一, 笹清人, 吉村健太郎, 山田篤, 宇山理紗, 須澤徹夫, 近津大地, 赤池孝章, 上條竜太郎
2. 発表標題 活性イオウ分子種は破骨細胞分化を促進する
3. 学会等名 第33回酸化ストレス学会関東支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Takimoto, Yoichi Miyamoto, Atsushi Yamada, Tetsuo Suzawa, Kiyohito Sasa, Tatsuo Shirota, Ryutaro Kamijo
2. 発表標題 Zoledronate promoted the expression of inflammatory cytokines in CD14+ cells in human peripheral blood mononuclear cells and inhibited their differentiation into osteoclasts
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 半月板再生用材料及び半月板再生用材料の作製方法	発明者 稲垣克記、須澤徹夫、糸瀬昌克、上條竜太郎、代田達夫、	権利者 学校法人昭和大学
産業財産権の種類、番号 特許、6338259	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/

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
研究分担者	上條 竜太郎 (Kamijo Ryutaro) (70233939)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	

	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
連携研究者	大隅 典子 (Osumi Noriko) (00220343)	東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	大津 真 (Otsu Makoto) (30361330)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関