

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19630

研究課題名（和文）発生における周囲環境の探索から導くiPS細胞自己組織化による歯胚エンジニアリング

研究課題名（英文）Self-organization of iPS cells using environmental factors in the tooth development

研究代表者

江草 宏（Egusa, Hiroshi）

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30379078

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、iPS細胞の自己組織化を利用した歯胚のバイオエンジニアリングを目的とした。歯胚発生に關与する特定の遺伝子発現を制御可能なマウスiPS細胞株を用いて3次元培養を行った結果、細胞塊からoral ectodermマーカーを発現する嚢胞性の構造体が生じた。また、マウスiPS細胞の歯原性上皮細胞への誘導法を段階的分化誘導により確立した。マウスiPS細胞塊を硬さの異なるハイドロゲルを用いて培養した結果、歯胚分化への有意な差は認めなかった。本研究で得られた情報はiPS細胞を用いた歯胚再生の実現に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、iPS細胞の自己組織化を利用した歯胚のバイオエンジニアリングを目的とし、発生の過程で細胞が周囲環境として認識するであろう細胞シグナル因子や力学的特性がiPS細胞の歯原性細胞への分化に及ぼす影響を検討した。本研究によって得られた、特定の遺伝子発現制御下における3次元培養法や段階的分化誘導法によって、iPS細胞を歯原性細胞塊に分化誘導する技術は、iPS細胞塊から歯胚としての極性が引き出せる可能性を示す情報を提供しており、今後の歯胚自己組織化の実現に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to establish a tooth engineering protocol by self-organization of iPS cells. Transcriptional regulation system was applied to mouse iPS cells in 3D culture to control expression of a tooth development-related gene. As a result, iPS cell aggregates formed cystic structures, which express oral ectoderm marker molecules. A step-wise induction method was also established to guide mouse iPS cells to differentiate into dental epithelial cells. When mouse iPS cells were cultured in hydrogels with different stiffness, effects of the stiffness on expression of tooth development-related genes were not significant. These results would contribute to promote iPS cell-based tooth engineering/regeneration in future.

研究分野：歯科補綴学・再生医学

キーワード：iPS細胞 自己組織化 再生歯科医療

1. 研究開始当初の背景

- (1) 近年、試験管内で細胞から三次元組織・器官そのものを構築して再生医療に用いるバイオエンジニアリング技術に期待が寄せられている。この背景には、分化多能性をもつ ES 細胞や iPS 細胞が、ひとつひとつの細胞が組織・器官としての役割を自ら認識しながら集合体として三次元的な組織を形成する、いわゆる「自己組織化」を誘導できる幹細胞であることがわかってきたことにある。ただし、この自己組織化によるバイオエンジニアリングは脳下垂体¹⁾、眼杯²⁾、腸管³⁾、皮膚器官⁴⁾等の組織・器官の報告に限られており、歯では未だ報告はない。
- (2) 幹細胞は、周囲の環境によって分化過程が調節される性質を有しており、細胞を培養する領域サイズを制限したり⁵⁾、基材の力学的特性(硬さ)を変えたりすると⁶⁾、異なる細胞分化パターンが出現する。このように、空間的環境と細胞分化プロセスとの関係は、多細胞システムがどのように形作られるのかを理解する上で必要不可欠である。
- (3) 多能性幹細胞である iPS 細胞は、浮遊培養によって三次元的な細胞凝集塊(胚様体)を形成する。本研究では、iPS 細胞に潜在する「歯胚への自己組織化スイッチ」には、発生過程を模倣した「細胞シグナル因子」や、上皮・間葉組織に特異的な「力学的特性(硬さ)」、「空間サイズ」等の周囲環境を引き金とした多細胞間コミュニケーションが重要であると仮説を基に実験を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、iPS 細胞の「自己組織化」を利用した歯胚のバイオエンジニアリングである。従来の歯胚再生アプローチは、別々に誘導した歯原性上皮と間葉を組み合わせる上皮間葉相互作用の誘導技術に基づくが⁷⁾、本研究構想は、多能性幹細胞の秘めたる自己組織化能を、三次元細胞培養技術を応用して引き出すことにより、iPS 細胞胚様体から直接的に歯胚器官の発生を誘導しようとする挑戦的かつ革新的な意義を有する。

3. 研究の方法

- (1) 特定の遺伝子発現シグナルが iPS 細胞の自己組織化に及ぼす影響
歯胚発生に關与する骨形成タンパク質(BMP)4 遺伝子の発現を制御可能なマウス iPS 細胞株(歯肉線維芽細胞由来)を用い、胚葉体から細胞塊を形成させた後に BMP4 の転写活性をオンにして 3 次元培養を行い、歯胚に關連する分子の発現を検討した。
- (2) 細胞シグナル因子が iPS 細胞胚葉体の歯原性細胞への分化に及ぼす影響
マウス iPS 細胞から形成した胚葉体を用い、歯原性上皮細胞/エナメル芽細胞への分化誘導法について、各種細胞シグナル因子(小分子化合物および成長因子)を組み合わせた段階的分化誘導を検討した。
- (3) iPS 細胞塊の大きさおよび培養基材の硬さが自己組織化に及ぼす影響
マウス iPS 細胞からハンギングドロップ法で均一なサイズの細胞塊を作製し、硬さの異なるハイドロゲルで上下から包み込むことで、iPS 細胞塊周囲の硬さが自発的な組織・器官への分化に及ぼす影響を検討した。細胞培養ゲルの硬さは、連携研究者の山本らが報告した方法である、polyacrylamide(PAAm)ハイドロゲルに添加する N,N'-methylenebisacrylamide(BIS)濃度を調整することで制御した⁵⁾。

4. 研究成果

- (1) BMP4 遺伝子発現シグナルが iPS 細胞の自己組織化に及ぼす影響
iPS 細胞の胚葉体から得た細胞塊を 3 次元培養しながら BMP4 遺伝子を強制発現させた結果、cytokeratin や oral ectoderm マーカーである Pitx を高発現する嚢胞性の構造体が生じた。この方法では同時に中胚葉關連遺伝子の発現も上昇することから、BMP4 の転写活性に中胚葉への分化誘導を阻害する小分子化合物および成長因子を併用した結果、中胚葉關連遺伝子の発現は減少し、非神経外胚葉および歯原性マーカー遺伝子の発現上昇を認めた。ただし、この歯原性細胞様細胞からなる構造体をマトリゲルに包んでマウス腎被膜下に移植しても歯胚様の構造は示さなかったことから、今後の検討課題として、歯胚の周囲環境を模したスキャフォールドを用いる等、さらなる工夫を要することが示唆された。
- (2) iPS 細胞胚葉体を用いた歯原性細胞への分化誘導法の確立
マウス iPS 細胞胚葉体に、BMP4 等リコンビナントタンパク質および各種シグナル伝達阻害/促進剤の添加の組み合わせおよび濃度を検討することで段階的分化誘導(非神経外胚葉系誘導、歯原性上皮誘導、エナメル芽細胞誘導)を検討した結果、CK14、ameloblastin、amelogenin、enamelin 等を高発現するエナメル芽細胞様細胞への分化誘導プロトコルが確立された。このプロトコルを amelogenin 遺伝子(Amelx)の発現を制御可能なマウス iPS

細胞株に適用し、分化誘導過程における *Amelx* の転写活性の影響についてマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、歯胚発生に重要な上皮間葉転換に関与する遺伝子に発現の相違を認めた。

一方、歯原性上皮細胞への分化誘導同様に、マウス iPS 細胞胚葉体から歯原性間葉細胞への分化誘導を検討していたところ、同様の研究を模索していた中国上海交通大学歯科補綴学講座の Xinquan Jiang 教授との共同研究に結び付いた。本研究に用いたマウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞胚葉体を用い、Otsu らの方法⁸⁾に従い神経堤細胞に分化誘導し、さらに BMP4 を添加することで DMP1、DSPP 等を高発現する象牙芽細胞様細胞に分化誘導することが可能であった。また、この神経堤細胞を脱細胞処理したヒト小臼歯のスライスをスキャフォールドに播種してマウス皮下に移植した結果、血管新生を伴う象牙質 歯髄複合体の再生を認めた⁹⁾。この知見は、脱細胞処理した歯が iPS 細胞の歯胚への自己組織化を誘導するスキャフォールドとして有用である可能性を示しており、今後の検討課題である。

(3) iPS 細胞塊の大きさおよび培養基材の硬さが自己組織化に及ぼす影響

マウス iPS 細胞塊を 4 段階の硬さの異なるハイドロゲルに包み込むことで、iPS 細胞塊周囲の硬さが自発的な組織・器官への分化に及ぼす影響を検討したが、歯胚発生に関わる非神経外胚葉分化への有意な差は認めなかった。一方、均一な iPS 細胞塊をハンギングドロップ法で作製し、BMP4 およびシグナル伝達阻害剤存在下で 3 次元培養すると、非神経外胚葉関連遺伝子群の発現が上昇したことから、この方法で得られる iPS 細胞塊のサイズは歯胚分化誘導に適している可能性が示唆された。

以上の結果から、本研究成果は、iPS 細胞から歯胚としての極性が引き出せる可能性を示す情報を提供しており、今後の歯胚自己組織化の実現に貢献することが期待される。

<引用文献>

- 1) Suga H et al. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature*, 480: 57-62, 2011.
- 2) Eiraku M et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472: 51-56, 2011.
- 3) Uchida H et al. A xenogeneic-free system generating functional human gut organoids from pluripotent stem cells. *JCI Insight*, 2: e86492, 2017.
- 4) Takagi R, Ishimaru J, Sugawara A, Toyoshima KE, Ishida K, Ogawa M, Sakakibara K, Asakawa K, Kashiwakura A, Oshima M, Minamide R, Sato A, Yoshitake T, Takeda A, Egusa H, Tsuji T. Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an in vivo transplantation model. *Sci Adv*, 2: e1500887, 2016.
- 5) Tanaka N et al. Simple agarose micro-confinement array and machine-learning-based classification for analyzing the patterned differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 12: e0173647, 2017.
- 6) Engler AJ et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126: 677-689, 2006.
- 7) Nakao K et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*, 4: 227-230, 2007.
- 8) Otsu K et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells Dev*, 21: 1156-1164, 2012.
- 9) Zhang M, Zhang X, Luo J, Yan R, Niibe K, Egusa H, Zhang Z, Xie M, Jiang X. Investigate the odontogenic differentiation and dentin-pulp tissue regeneration potential of neural crest cells. *Front Bioeng Biotechnol*, 8: Article 475, 2020.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Zhang M, Zhang X, Luo J, Yan R, Niibe K, Egusa H, Zhang Z, Xie M, Jiang X	4. 巻 8
2. 論文標題 Investigate the odontogenic differentiation and dentin-pulp tissue regeneration potential of neural crest cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Bioeng Biotechnol	6. 最初と最後の頁 Article 475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3389/fbioe.2020.00475	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13件（うち招待講演 13件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 In vitro bone tissue fabrication by using iPS cells
3. 学会等名 96th IADR General Session 国際シンポジウム “Biodental Engineering-Towards Real Tissue Synthesis in vitro”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Development of a novel technology for targeted differentiation of iPS cells by Notch signaling inducible biomaterials
3. 学会等名 日本学術振興会/タイ学術会議合同国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 iPS cell-based strategies in bone tissue engineering
3. 学会等名 5th Airlangga University Joint Scientific Meeting in Dentistry（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 iPS cell-based strategies for bone and cartilage bioengineering
3. 学会等名 2018 Chonnam National University School of Dentistry & Dental Hospital International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 iPS Cell-Based Strategies for Bone Tissue Engineering
3. 学会等名 China-Japan Dental Science Symposium 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 iPS Cell-Based Strategies for Bone Bioengineering
3. 学会等名 Chulalongkorn University Symposium 国際シンポジウム “Trends in Regenerative Dentistry” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 iPS細胞が描く歯科医療の未来
3. 学会等名 群馬県歯科医学会学術大会 特別講演 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 インプラント補綴治療における再生医療の現状と挑戦
3. 学会等名 会津方部歯学研究会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 iPS細胞を用いた骨/軟骨バイオエンジニアリング
3. 学会等名 第128回 日本補綴歯科学会学術大会 シンポジウム「Biodental Engineering - 再生歯科補綴に向けた人工臓器の創成 -」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Emerging Approaches for Regenerative Prosthodontics
3. 学会等名 18th International College of Prosthodontists & 43rd European Prosthodontic Association（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 iPS Cell-Based Strategies in Bone Tissue Engineering
3. 学会等名 2nd Joint Symposium Between School of Stomatology Wuhan University and Tohoku University Graduate School of Dentistry（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Emerging Approaches for Regenerative Prosthodontics
3. 学会等名 Tohoku-Taiwan-YangMing Dental Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Emerging Approaches for Regenerative Prosthodontics
3. 学会等名 8th International Students' Dental Conference 2020, University of Sharjah Dental Student Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	新部 邦透 (Niibe Kunimichi) (50468500)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究協力者	山本 雅哉 (Yamamoto Masaya) (10332735)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	