

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19116

研究課題名(和文) Organ-on-a-Chip技術を応用した新規歯胚分化誘導法の開発

研究課題名(英文) The novel iPSCs differentiation method toward tooth organ by applying the Organ-on-a-Chip technology

研究代表者

堀江 尚弘 (Horie, Naohiro)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：30802318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間を通じ、ヒトiPS細胞の歯胚上皮細胞への分化誘導法の最適化をおこなった。先行研究にて歯胚の分化に関与すると報告されているBMP-4や、TGF-beta阻害剤(SB)、Wnt/beta-Cateninシグナルの活性化因子である塩化リチウム(Lithium Chloride; LiCl)に着目し、フィーダーフリー環境に馴化したヒトiPS細胞を、上記因子を添加した歯胚上皮細胞分化誘導培地にて培養した。同培地において、各因子の添加の有無および、LiClに関しては種々の濃度で添加した際の、各分化段階の細胞における遺伝子発現を解析する事で、ヒトiPS細胞の歯胚上皮細胞への最適な分化条件を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果として、フィーダーフリー環境に馴化したヒト由来iPS細胞を対象とした、歯胚上皮細胞への分化誘導法の最適化に関する所見が得られた。同所見は、iPS細胞からエナメル芽細胞等、歯胚上皮系の細胞・組織を樹立する方法を確立する一助となり、発生学的な研究への応用や、齲蝕治療等において既存の手法を更に発展させる、技術革新に応用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this term for the research, the optimization of the method for human iPSC cells (hiPSCs) differentiate towards the dental epithelial cells has performed. After hiPSCs were adapted in the feeder-free environment, cultured in the dental epithelial cell differentiation medium which contained the BMP-4 (BMP-4 had reported as the essential factor to form the tooth germ) and the Lithium Chloride (LiCl; Wnt/beta-Catenin signal activating factor). I prepared the differentiation medium has been added such factors in several concentration manners and cultured the hiPSCs in different component medium. Finally, gene expression analysis of the cells has been conducted in some differentiation stages. According that, the optimized condition has been discovered for hiPSC's dental epithelial differentiation.

研究分野：外科系歯学

キーワード：歯の再生 iPS細胞 分化誘導

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

欠損歯の補綴治療として再生歯胚を応用することは大いなる目標であり、これまで多くの検討が成されてきた (Nakao K ら, *Nat Methods*. 2007, Oshima M ら, *PLoS One*. 2011)。しかしながら現在、直ぐに臨床へと応用可能な技術は確立できておらず、生体で機能出来る再生歯を安定して生成可能な、新たな手法の確立が求められている。

新たな歯胚再生方法を創造するためには、歯の発生メカニズムをより詳細に再現することが課題となる。歯の発生機構における重要な要素の一つとして上皮-間葉相互作用があり (Thesleff I, *J Cell Sci*. 2003)、これまで報告されている歯胚分化誘導法は、上皮系の細胞および間葉系細胞を様々な手法で共培養させ、それらの相互作用を利用して歯胚細胞へと分化させている。分化誘導法の実例としては、上皮・間葉系細胞をそれぞれゲルに包埋して結合させた、器官原基法を応用した手法や (Oshima M ら, *Methods Mol Biol*. 2012)、磁性ナノ粒子を取り込ませた上皮・間葉系細胞由来の 2 枚のシートを磁力で密着させて培養した報告がある (Koto W ら, *Nanomaterials*. 2017)。こうした手法は 2 種類の分化系統の細胞を人為的に接触させて相互作用を惹起し、生理的な歯の発生機構を模倣したものである。ただし、器官原基法は成熟したエナメル質・象牙質形成に際してマウス腎被膜下への移植を必要とし、磁性ナノ粒子を応用した手法で形成される組織は、重層化した細胞シートであるため、共に *in vitro* の操作のみでは、生体で機能し得る歯胚組織を形成できていない。こうした学術的背景を踏まえ、本研究課題の核心として、「歯胚への安定した分化誘導を実現するには、上皮-間葉相互作用をどのように制御し、歯の発生過程を再現すれば良いか。」という問いを設定した。

### 2. 研究の目的

上述の背景を元に、本研究の目的を「歯胚への安定した分化誘導を実現するための、上皮-間葉相互作用の正確な再現と応用」と設定した。また、同目的を達成する為に、細胞間相互作用の再現に適したツールである *Organ-on-a-Chip* 技術を用いて、歯胚細胞の上皮-間葉相互作用を模倣し、歯胚への安定した分化誘導の実現を図る方針としていた。

具体的には、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を歯胚上皮・間葉系細胞へと分化誘導し、それぞれの細胞を培養面積約 1 cm<sup>2</sup> の *Chip* の上で共培養して歯胚発生における細胞の微小環境を再現し、歯の発生モデル *Chip* の確立を試みる計画としていたが、*Chip* 上での安定した細胞培養が困難であったため、研究目的を「iPS 細胞の歯胚細胞への安定した分化誘導系を確立すること。」に変更し、以下の検討をおこなった。

### 3. 研究の方法

ヒト由来の iPS 細胞 (hiPS 細胞) をオンフィーダーに播種・培養したものを、ラミニンコーティングディッシュ上へ移し、3 回以上継代して hiPS 細胞をフィーダーフリー環境に馴化させた。フィーダーフリー iPS 細胞を 6 well プレート上に播種し、歯胚上皮細胞分化誘導培地にて培地交換・継代培養をおこなった。

分化誘導法は、歯胚上皮細胞の発生段階に倣って 3 段階に分かれており Stage 1 を surface ectoderm, Stage 2 を dental epithelial cells, Stage 3 を ameloblast の段階とした。

Stage 1 の検討として、基本となる培地に TGF-beta 阻害剤 (SB もしくは SB43) の添加の有無および、追加で BMP-4 を添加した群を設定し、遺伝子発現の比較検討をおこなった。また、外胚葉誘導に最適な添加因子の組み合わせを決定した後、これまで基本の組成としていたフィーダーフリー用培地 (StemFit 群) を、オンフィーダー培養用の培地に変更した群 (primate ES 群) もしくは DMEM/F12 に KSR を添加した培地を使用した群 (KSR 群) を設定して、同様に外胚葉系のマーカー遺伝子が最も発現している条件を選出した。Stage 2 については、培養期間を通じて各種濃度 (0, 10, 15, 20, 30 μM) の塩化リチウム (Lithium Chloride ; LiCl) を分化誘導培地へ添加し、遺伝子発現を解析した。最後に Stage 3 については、これまで Stage 2 までに設定した最適条件を踏まえつつ、LiCl を 0, 10, 15, 20 μM の各濃度で培地に添加した際の各種マーカー遺伝子の変化を検知し、歯胚上皮細胞分化誘導における最適な条件の探索を試みた。

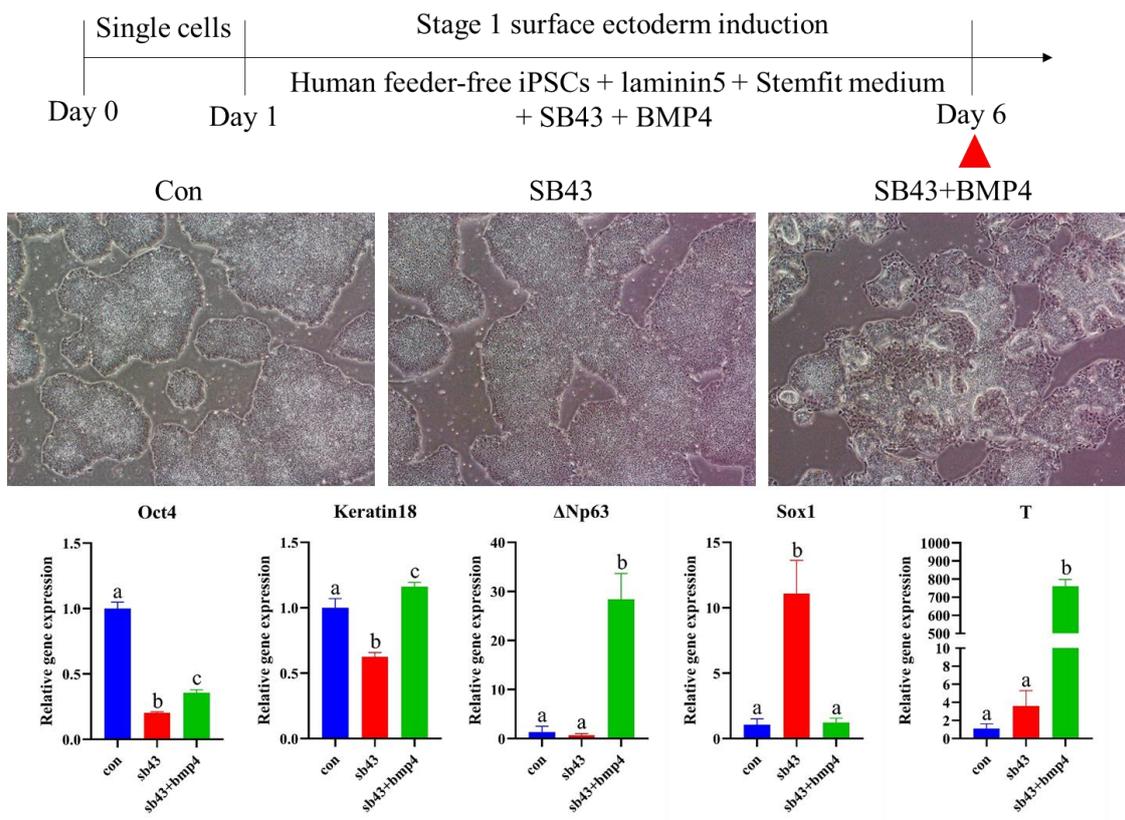
### 4. 研究成果

フィーダーフリー環境に馴化した hiPS 細胞の歯胚上皮細胞への分化誘導について、各分化 Stage の最適化を試みた。

Stage 1 ; surface ectoderm の段階については、分化誘導培地に SB43 と BMP-4 を共に添加した

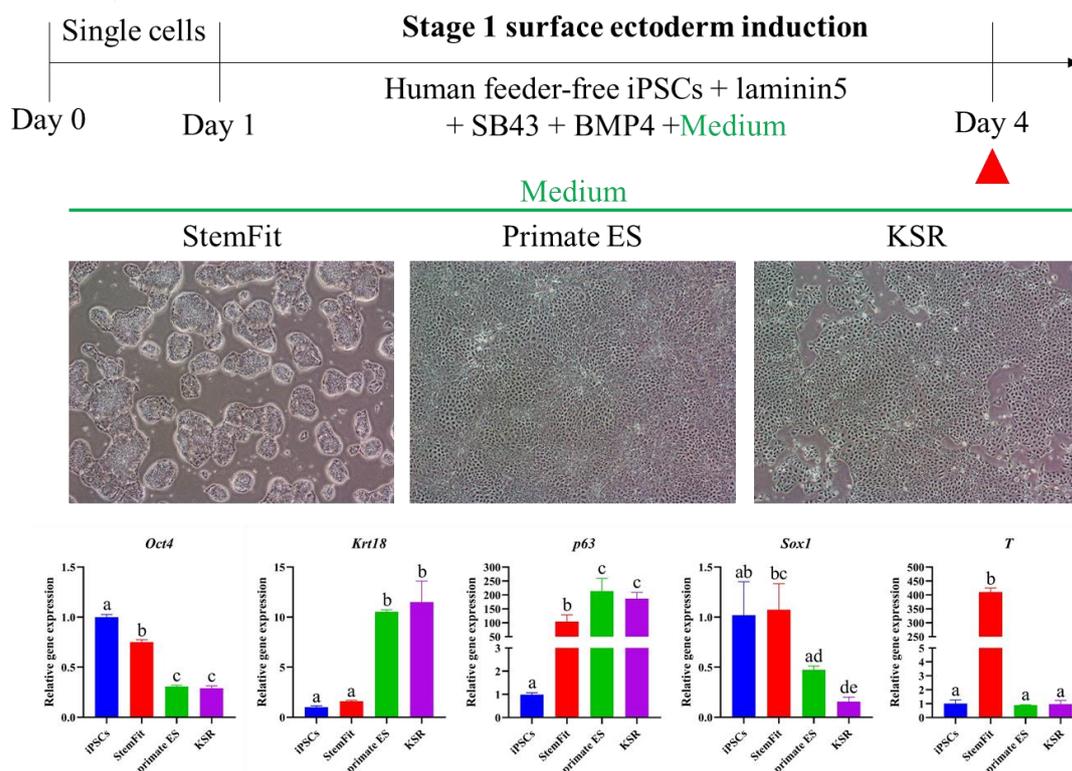
群で、上皮系のマーカー遺伝子である Keratin18, p63 の発現が上昇していたが、中胚葉マーカーである T の遺伝子発現も上昇していた (図 1)。

図 1 ; Stage 1 の検討-1



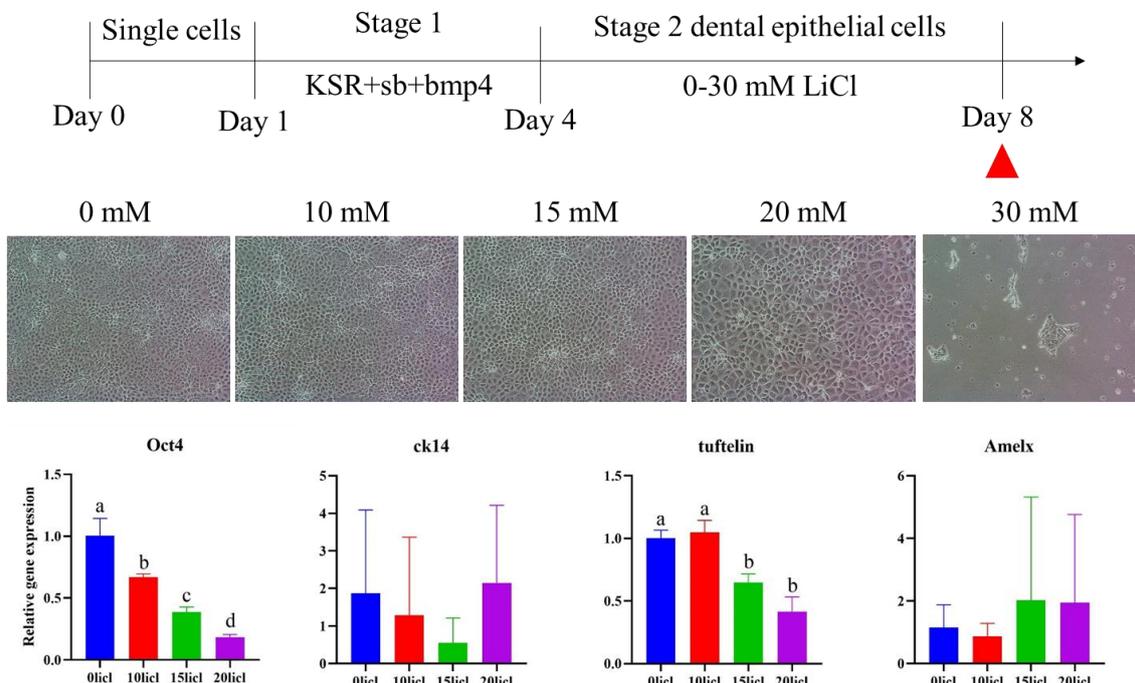
続いて、分化誘導培地中に SB43 および BMP-4 を共に添加した Stage 1 の分化段階の細胞に関して、基本となる培地の組成を検討した。KSR 群で Keratin18, p63 が上昇していた一方で Sox1, T の発現が最も低下しており、特異的な表皮外胚葉誘導がみられた (図 2)。

図2; Stage 1 の検討-2



Stage 2 においては 0-30 mM の LiCl を添加し、各種分化マーカー遺伝子の発現を確認したところ、分化誘導 Day 8 の時点で、30 mM 添加群は殆どが細胞死となっており、20 mM 以下の濃度でみると、濃度が上昇するにつれ、未分化マーカーの低下を認めた。故に、LiCl によって何らかの系統へ分化が促進されることは判明したが、上皮系のマーカーおよびエナメル芽細胞のマーカー遺伝子に関しては、一定した発現傾向が認められない結果となった (図 3)。

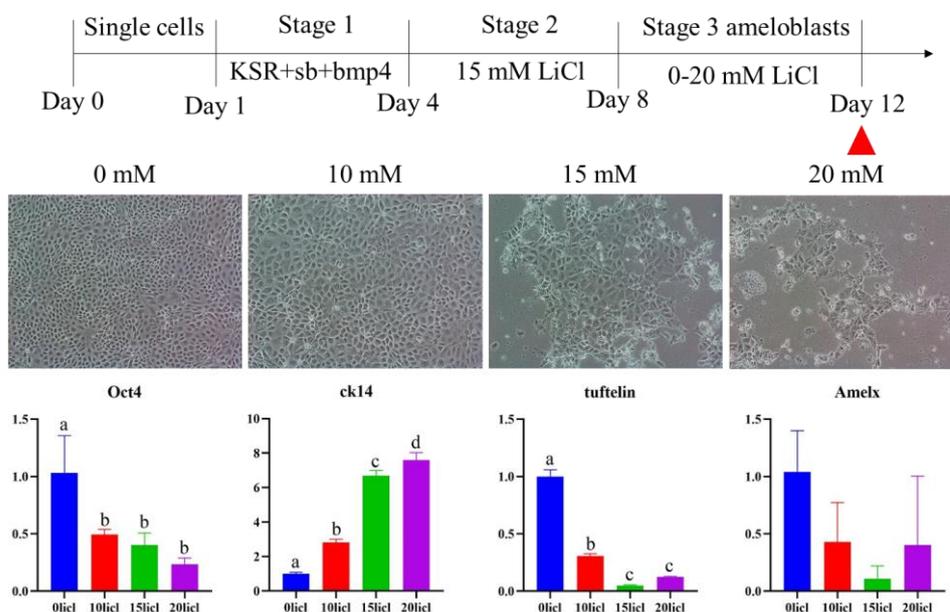
図3; Stage 2の検討



ここで、細胞死の傾向がみられない、15 mM 群を Stage 2 における LiCl の設定濃度とし、最後の Stage 3 の検討をおこなった。

上皮マーカーである ck14 遺伝子発現が LiCl の濃度依存的に上昇しており、20 mM 群で最大となっていた一方で、エナメル芽細胞のマーカーである tuftelin, Amelx については対照群 (LiCl 非添加群) と比較して遺伝子発現の上昇を認めなかった (図 4)。本条件下では iPS 細胞は上皮系の細胞には分化しているが、エナメル芽細胞までは完全には分化できていないことが示唆された。

図4; Stage 3の検討



以上のことから、Stage 1 は KSR を含む基礎培地に SB・BMP4 を両方添加し、Stage 2 においては 15 mM の LiCl を、Stage 3 では 20 mM の LiCl を加えた条件が、ヒト iPS 細胞の上皮系への分化誘導条件に適していると考察された。

今後の方策として、まずは歯原性上皮の発生機序をより厳密に模倣した、分化誘導条件を再検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 帆足 有理恵, 堀江 尚弘, 森本 悟
2. 発表標題 歯科補綴学研究者による iPS細胞研究が拓く病態解析 と創薬の未来
3. 学会等名 公益社団法人 日本補綴歯科学会第 128 回学術大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------