

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390470

研究課題名(和文)細胞リプログラミングを応用した人工口腔組織幹細胞の作成とその評価

研究課題名(英文) Production and Evaluation of artificial oral tissue stem cells applied cell reprogramming

研究代表者

福本 恵美子 (Fukumoto, Emiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10264251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、組織細胞を人工的に組織幹細胞に誘導し、再生医療への応用を目指すものである。

これまで、GSK3b inhibitor IXが歯髄細胞を歯髄幹細胞に誘導し、幹細胞マーカーが発現が誘導されることを明らかにした。誘導された乳歯由来ヒト人工歯髄幹細胞を、ハイドロキシアパタイトをキャリアーとしてマウス皮下に移植した結果、ハイドロキシアパタイトが完全に吸収され、ヒト由来血球細胞を含む骨髄細胞を伴う大量の骨組織の形成が確認された。以上の結果は、我々の用いた人工組織幹細胞誘導法により、ヒトの骨髄を作製できた画期的な成果であり、白血病等の血液疾患の治療に応用可能な技術として期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is the application of multipotent stem cells artificially induced from tissue cells to regenerative medicine.

We revealed that GSK3b inhibitor IX induced tooth pulp cells to pulp stem cells, and mediated marker of stem cell. As a result of the transplantation of induced pulp stem cell derived from human deciduous teeth to subcutaneous of mouse using hydroxyapatite as a carrier, hydroxyapatite was absorbed completely and produced substantial bone tissue included human derived blood cells. These results are the innovative discovery that artificial induction of tissue stem cells generated human bone marrow, and the method is expected as the applicable technique for the treatment of blood disorder such as leukemia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：幹細胞 口腔組織 歯髄

1. 研究開始当初の背景

再生医学的な技術の進展により、各組織に存在する幹細胞の同定、その細胞の分化誘導法の開発などが行われ、今までは夢物語であった再生医療が現実のものとなってきている。

口腔組織においても様々な幹細胞が存在し、口腔粘膜の幹細胞を応用し角膜移植が実現可能となり、歯髄中に存在する歯髄幹細胞から、骨芽細胞、象牙芽細胞、神経細胞などへの分化誘導が可能となってきた。しかしながら、幹細胞は、組織内において少量(0.5-1.0%程度)しか存在しない為、実際の臨床応用の為には十分な量の幹細胞の確保が次の課題となってきた。

また、近年開発された iPS 細胞は、分化した細胞に 4 つの因子を遺伝子導入する方法で、ES 細胞や受精卵に近い性質の細胞へと未分化誘導(リプログラミング)した細胞であり、個体発生まで可能であることから、再生医療への応用が期待されている。しかしながら、個体発生可能であることが倫理的問題を生じ、また癌化の危険性を回避できないため、まだまだ解決しなければならない問題も多い。

そこで我々の研究グループでは、分化した細胞を iPS などの万能細胞に誘導するのではなく、部分的に未分化状態に誘導し、人為的に組織幹細胞を誘導する方法を発見した(88th IADR 2010 で発表)。この手法では、単一の薬剤(GSK3beta inhibitor IX)の添加により分化した組織細胞(歯髄細胞)から幹細胞(歯髄幹細胞)へ誘導し(部分的なリプログラミング)、骨芽細胞などに分化誘導可能な細胞へと導くことが可能となった。単一の薬剤処理で良いことから、遺伝子導入に伴う発癌のリスクを回避でき、組織幹細胞への誘導であるということで、倫理的問題も回避できると考えられた。しかしながら、歯髄幹細胞の特徴である神経細胞への誘導効果が軽微であることから、神経再生への応用の為には、神経細胞誘導能の付加が必要であると考えられた。

一方、日本小児歯科学会を中心とした「乳歯を用いた再生医療技術開発」プロジェクトにより、幹細胞の供給源としての交換期の乳歯歯髄細胞の培養が、各大学で段階的に実施できるようになり、歯髄幹細胞の培養条件や、採取する為に適した乳歯の交換時期、歯種などが、この数年の間に決定されることが予想される。このような背景から、採取された歯髄細胞を適切に細胞処理し、大量に幹細胞を調整する技術と、調整した細胞の多分化能を維持するシステムの構築が、歯科再生医療実現の為に

急務であると考えられた。

2. 研究の目的

歯髄中に存在する再生医療に应用可能な幹細胞を大量調整する為に、完全に分化した口腔組織から、薬剤や遺伝子導入を用いた方法で、直接幹細胞を誘導する方法を確立し、その細胞機能評価を行うことで、人為的な組織幹細胞誘導法の開発を実施する。

具体的には、

- (1) 歯髄幹細胞、歯髄細胞の遺伝子発現の差について、包括的な遺伝子スクリーニング。
- (2) 歯髄細胞に幹細胞特異的な遺伝子発現ベクターの導入、あるいは遺伝子発現誘導薬剤を処理
- (3) 未分化誘導(リプログラミング)の評価
- (4) 人工幹細胞による組織構築法の開発(人工歯胚、人工唾液腺など)

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞、歯髄幹細胞、薬剤誘導歯髄幹細胞の 3 種の細胞における遺伝子発現の差を解析

包括的な遺伝子スクリーニング

組織細胞(歯髄細胞株:mDP 細胞) 組織幹細胞(歯髄幹細胞株:mDP-SP 細胞) 薬剤処理 mDP 細胞(mDP-GSK3bi-IX)を細胞密度 60%程度で培養した後、mRNA および microRNA の抽出。抽出した mRNA はアフィメトリックス社の cDNA アレーを用い、また microRNA に関しては KURABO のジェノパール miRNA アレーを用いて解析。

(2) FDA で承認の薬剤ライブラリーより、新規の幹細胞誘導薬剤のスクリーニングを実施

96 ウェルプレートにコートされた各種薬剤(約 40 プレート)に対し、歯髄細胞株 mDP 細胞を培養し、細胞形態の変化について 24, 48, 72 時間の時点において観察する。(薬剤コートプレートに関しては、FDA から供与)従来解析から、歯髄細胞株 mDP 細胞は細胞が大きく広がった形態を有するが、歯髄幹細胞は細胞形態が紡錘形を有していることが分かっている。そこで、薬剤添加により細胞形態に変化を示す薬剤の同定を試みる。

(3) スクリーニングされた遺伝子、薬剤を組織細胞に処理し、未分化状態を維持する条件を決定

未分化状態を誘導する可能性がある遺伝子について真核細胞発現ベクター(pEF6/V5-His-TOPO)に組み込み作業を実施。未分化誘導の候補となる薬剤を細胞に処理し、24-72 時間の範囲において、薬剤の効果

を細胞形態、未分化マーカーの発現から評価。従来の解析から、歯髄細胞株 mDP 細胞は細胞が大きく広がった形態を有するが、歯髄幹細胞は細胞形態が紡錘形を有していることが分かっている。そこで、薬剤添加により細胞形態に変化を示す薬剤の同定。

(4) 上記で作製された人工組織幹細胞における多分化能を評価
遺伝子導入、薬剤処理により未分化状態への誘導が可能となった細胞について、骨誘導、象牙芽細胞誘導、神経誘導、脂肪誘導確認し、多分化能の評価骨誘導においては、オステオカルシンの遺伝子発現、アルカリホスファターゼの活性、Von Kossa 染色による石灰化の確認を行う。象牙芽細胞誘導に関しては、DSPP や TM14 遺伝子の発現を確認する。脂肪誘導は、PPAR α の遺伝子発現、Oil red-O 染色による脂肪滴の確認を行う。さらに神経誘導に関しては、ニューロフィラメント遺伝子の発現、神経突起の進展を評価する。それぞれの誘導に関しては、専用の分化誘導培地を使用する。

これらの結果を応用し、他の口腔組織でも同様の実験を実施するとともに、作製された組織幹細胞を用いた人工歯胚構築を目指す。新たに誘導した歯髄幹細胞をもちい、人工歯胚を作成し、歯の形成能を評価
人工的に誘導した歯髄幹細胞と、マウス胎児由来歯原性上皮細胞をもちいて、再構成歯胚を作製し、人工歯髄細胞の歯の構築能について検討。また人工歯髄細胞を臨床応用する為に必要な、骨誘導、神経誘導プロトコールの作成も同時に行う(ヒト歯髄細胞をもちいた実験を実施)。

4. 研究成果

歯髄細胞、歯髄幹細胞、薬剤誘導歯髄幹細胞における遺伝子発現について、cDNA マイクロアレイを用いた解析を行った結果、歯髄幹細胞では幹細胞マーカーである Oct4, KLF4 の発現を認め、これらのマーカーに関しては、薬剤誘導歯髄幹細胞においても確認できた。また、薬剤誘導歯髄幹細胞に特異的に発現する遺伝子群も約 30 遺伝子ほど確認でき、薬剤誘導により歯髄幹細胞様の細胞に誘導できるが、完全に歯髄細胞と同じような遺伝子発現パターンを示さないことが明らかとなった。

FDA で承認の薬剤ライブラリー(ケミカルコンパウンド、ナチュラルコンパウンド)を用いて、分化した歯髄細胞に添加し、歯髄細胞に特徴的な細胞形態である紡錘形の形に誘導される薬剤のスクリーニングを行なっ

た。細胞の形態評価においては、Alexa594-ファロイジンを用いた F-アクチン染色と、メタモルフソフトウェアを用いた形態評価を行なった。約 120,000 の薬剤ライブラリーのうち 5 種類の薬剤が歯髄幹細胞に特徴的な紡錘形への細胞形態変化を示すことが明らかとなった。このうち 1 つは、これまで同定していた GSK3beta inhibitor IX であり、それ以外では HDAC インヒビターなどのクロマチンリモデリングに関わる分子であった。

次に、GSK3beta inhibitor IX も含めたコンパウンドを用いて、歯髄細胞に添加し、骨誘導能について in vitro および in vivo の評価を行った。GSK3beta inhibitor IX で歯髄細胞株 mDP を 48 時間処理し、その後通常の骨誘導培地で培養したもの、さらに BMP2 を添加した条件下で 1 週間培養を行なった。BMP2 を添加した培地においては、コントロールにおいても Von Kossa 陽性の石灰化組織を形成したが、GSK3beta inhibitor IX で事前処理した細胞においては、Von Kossa 陽性の染色強度が 5 倍以上に増加していた。また、BMP2 を添加しない培養条件においても、GSK3beta inhibitor IX で未処理の細胞においては、わずかに Von Kossa 陽性細胞が認められる程度であったが、薬剤処理群では優位に Von Kossa 陽性細胞の増加を認めた。この結果は、歯髄幹細胞中には、わずかな歯髄幹細胞が存在し(FACS による解析では、本細胞で 0.8%程度) その細胞が骨誘導培地により骨芽細胞に分化したものと考えられるが、GSK3beta inhibitor IX で前処理した細胞においては、ほぼすべての細胞が歯髄幹細胞に誘導され、それが骨誘導培地により骨芽細胞に分化誘導されたために、Von Kossa 陽性細胞が増加したものと考えられる。さらにこの石灰化の程度は BMP2 により増強されることが明らかとなった。一方、骨誘導培地に GSK3beta inhibitor IX を添加し、本コンパウンドが持続的に作用する条件下で実験を行った結果、いずれの条件においても Von Kossa 陽性細胞の発現は認められなかった。

そこで、GSK3beta inhibitor IX がどのような分子メカニズムで、未分化誘導し、さらに骨芽細胞分化に至るのか、前述の cDNA マイクロアレイのデータを、IPA ソフトウェアを用いて、分子間相互作用の予測を行なった。BIO は、Oct4 や Klf4 の発現を誘導するが、Sox2 などの幹細胞マーカーの発現は誘導しなかった。このことは、薬剤誘導性の歯髄幹細胞は、iPS 細胞や ES 細胞のように、万能性を有する細胞で無く、組織幹細胞までしか未分化誘導できないことが分かった。しかしながら、Oct4 や Klf4 を単一薬剤で誘導できる

ことは、iPS 細胞を誘導するための遺伝子導入を伴わない薬剤コンパウンドとして利用できる可能性が示唆された。骨芽細胞分化に関わる因子としては、GSK3beta inhibitor IX Smad7 の発現を上昇させることが明らかとなった。Smad7 は、抑制系の Smad 分子であり、BMP2 等の骨誘導シグナルにおいて、活性化された Smad2/3 に抑制的に作用する。したがって、GSK3beta inhibitor IX を添加した際に、Smad7 が誘導されることで、BMP2 等の骨誘導刺激が行なわれても、骨芽細胞に分化しない、つまり未分化状態の維持に貢献している分子と考えられる。実際、GSK3beta inhibitor IX を添加し続けると、BMP2 の誘導刺激においても Von Kossa 陽性とならない結果と一致する。一方、GSK3beta inhibitor IX の刺激を解除すると、Smad7 の発現は低下し、BMP2 の刺激に対してはもはや抑制的に細胞しないために、薬剤により未分化誘導された歯髄幹細胞が骨芽細胞に分化できるのだろうと考えた。

さらに、この GSK3beta inhibitor IX で前処理した細胞の in vivo での骨誘導能を評価するために、SCID マウスの皮下にハイドロキソアパタイトをキャリアとして注入し、骨形成能の変化を観察した。薬剤処理しないヒト歯髄細胞とハイドロキソアパタイトを注入したマウスにおいては、ハイドロキソアパタイトの周囲に骨様の組織形成を認めた。一方、GSK3beta inhibitor IX で前処理した細胞をハイドロキソアパタイトとともに注入（注入時には GSK3beta inhibitor IX は添加していない）したマウスにおいては、コントロールでハイドロキソアパタイトが吸収されずに存在している時期において、速やかにハイドロキソアパタイトが完全に吸収され、多量の骨形成とその間に骨髄の形成を認めた。ヒトの歯髄細胞由来の骨髄細胞が、血球を作ることができる機能的な骨髄であるかどうかを確認するために、移植したマウスの末梢血を採取し、抗ヒト CD11b により染色した後、フローサイトメーター（FACS）にて陽性細胞の確認を行なった。GSK3beta inhibitor IX で前処理せずにハイドロキソアパタイトとともに移植した実験群においては、末梢血において CD11b 陽性のヒト由来血球細胞の確認はできなかった。一方、GSK3beta inhibitor IX で前処理したのちに移植したヒト歯髄細胞においては、末梢血中の単球分画において抗 CD11b 陽性の細胞が約 15%程度確認できた。さらに驚くべきことに、移植されたマウスは、移植後 2 か月ほどから多臓器不全により死に至ることが明らかとなった。つまり、ヒト由来細胞から誘導された骨髄から、機能的な血球系細胞が形成され、これらの細胞がマウ

スの組織を攻撃するために、多臓器不全が生じた物と考えられる。これはヒトの骨髄移植や臍帯血移植後に認められる GVHD に似た症状であると考えられた。

以上の結果から、我々は、単一の薬剤により分化した歯髄細胞を、より未分化で多分化能を有する細胞に人工誘導することに成功した。今回主に用いた薬剤は、GSK3beta inhibitor IX であるが、類似の作用を有する薬剤の同定にも成功した。

薬剤により処理した細胞においては、幹細胞マーカー分子の発現が誘導される一方で、各組織に分化できないような機構（例えば Sma 7 を誘導し、骨芽細胞へ分化しないようにする等）が働き、未分化状態の維持を行なっていることが示唆された。GSK3beta inhibitor IX においては、その効果はリーバースブルであり、薬剤を培養液から除くことで、目的の細胞に分化誘導することが可能となった。

一方、GSK3beta inhibitor IX で前処理で処理した細胞は、in vitro および in vivo において骨誘導が可能であり、骨再建を目指した再生医療に応用可能な技術として発展させることが可能と考えた、さらに SCID マウスへの移植においては、骨髄を誘導することが可能であり、この人工誘導骨髄を応用すれば、自己の細胞由来の骨髄を作製することも可能で、この骨髄移植においては免疫抑制剤を用いなくても、拒絶反応の生じない治療技術に発展させることができ、白血病治療等において免疫抑制不要でかつ GVHD などの移植後の副作用を回避できる治療が確立できることが予想され、本研究の成果は再生医療において多大な貢献をするものを期待される。

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 4 件)

Hino R, Furagi M, Yamada A, Arakaki M, Saito K, Sugawara Y, Ono M, Fukumoto E, Nakamura T, Fukumoto S., Establishment of ex vivo mucocele model using salivary gland organ culture, 査読有、Pediatric Dental Journal, 2014, in press

Fukumoto S, Nakamura T, Yamada A, Arakaki M, Saito K, Xu J, Fukumoto E, Yamada Y., New insight into the functions of enamel matrices in calcified tissues, 査読有、Japanese Dental Science Review, 2014, in press

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. 査読有、J Biol Chem. 2012 Mar 23;287(13):10590-601. DOI: 10.1074/jbc.M111.285874.

Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto E, Masuyama R, Yoshida N, Takano-Yamamoto T. IL-12 and IL-18-mediated, nitric oxide-induced apoptosis in TNF- α -mediated osteoclastogenesis of bone marrow cells. 査読有、Calcif Tissue Int. 2011. Jul 98(1):65-73. DOI:10.1007/s00223-011-9494-0.

[学会発表](計 2件)

菅原優、山田亜矢、福本恵美子、相澤志津子、岩本勉、福本敏：新規エナメル質コート材（PRG バリアコート）のイオン徐放性による再石灰化促進について．第 49 回日本小児歯科学会 2011.11.29 いわて県民情報交流センターアイーナ 盛岡市

福本敏、岩本勉、福島秀文、山田亜矢、新垣真紀子、福本恵美子、中村卓史、自見英治郎：NF- κ B 経路を介した歯の形態形成分子制御機構．第 84 回日本生化学会 2011.9.23. 国立京都国際会館 京都市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福本 恵美子 (Fukumoto, Emiko)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：10264251

(2)研究分担者

阪井 丘芳 (Sakai, Takayoshi)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：90379082

山田 亜矢 (Yamada, Aya)
東北大学・大学院歯学研究科・準教授
研究者番号：40295085