

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659819

研究課題名(和文) iPS細胞由来奇形腫による歯胚発生のマスターキー遺伝子探索と器官再生への展開

研究課題名(英文) The search for the master regulatory genes for tooth development using iPS cell derived teratomas

研究代表者

菊池 和子 (KIKUCHI, KAZUKO)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：40326690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(iPS細胞)のつくる奇形腫には歯の器官形成がみられない。そこで、我々はiPS細胞由来の奇形腫の発生、成長過程を詳しく調べ、歯の器官形成に関わる因子を外部から導入することで奇形腫内に存在する幹細胞から歯を再生できないかと考えた。iPS細胞由来奇形腫には形成過程で上皮幹細胞マーカー陽性の細胞が存在することから、この細胞を分化させることで歯の発生を誘導できることが示唆された。また歯胚上皮特異的遺伝子Sp-6を遺伝子導入し、奇形腫内に上皮を増殖させることに成功した。これらの結果は、歯の再生研究の新たな新機軸になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：iPS cells-derived teratomas do not contain tooth germ. Therefore, we hypothesized that we could induce tooth development from the stem cells in the teratomas by the introduction of exogenous tooth morphogenesis-related genes. During teratoma formation, iPS cells differentiated into epithelial cells and formed various types of epithelial tissue. Our results also indicate that these epithelia included epithelial stem/progenitor cell marker positive cells. Further, we succeeded in the introduction of tooth germ epithelium specific gene, Sp-6, into the teratomas, and which induced epithelial differentiation. These results will develop innovations for the study of tooth regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：iPS細胞 奇形腫 歯 発生 再生医学

1. 研究開始当初の背景

ヒト卵巣奇形腫は、腫瘍の内部に歯、毛、骨などがさまざまな器官が入った特殊な腫瘍である(図1)。

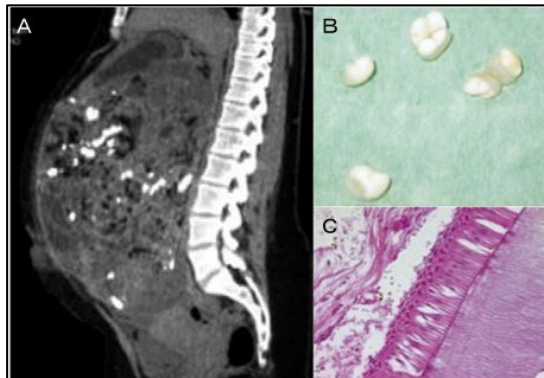


図1 ヒト奇形腫で見られる歯の形成
A: ヒト奇形腫レントゲン写真
B: 奇形腫より抽出された歯
C: 抽出された歯の組織像 (Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod, Devoize et al. 2008)

しかし、倫理的問題による制約や、サンプル数の不足などの理由から、これを研究対象とした報告は少ない。一方、iPS細胞の場合は皮下移植によって実験的に奇形腫を作製できるが、その中に歯や毛の器官形成は行われない。

我々は iPS 細胞奇形腫の発生、成長過程を解析した結果、移植後1週目から上皮細胞への分化が始まること、またその中に歯の上皮幹細胞が存在することを見いだした(図2)。

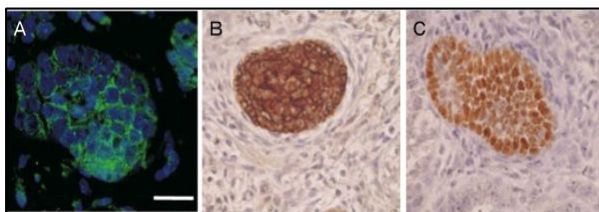


図2 iPS細胞奇形腫で見られる上皮幹細胞マーカー陽性細胞
A: CD49f, B: p63, C: CK14

ここから我々は、iPS 細胞奇形腫には発現しない歯の器官形成に関わる因子群を外部から導入することで、奇形腫内に存在する幹細胞から歯を再生できないかと考えた。

2. 研究の目的

iPS 細胞の奇形腫に歯の器官発生を

誘導させることを目的に到達目標を設定した。

- (1) 奇形腫の成長過程をより詳細に検索し、歯の幹細胞が発生する時期を特定する。
- (2) (1)の結果を基に遺伝子導入の最適な時期、さらに導入する遺伝子群の候補を決定する。
- (3) (1)~(2)のトライアルアンドエラーを繰り返して器官発生を誘導する技術を確立していく。
- (4) 歯の発生が成功したら、その発生過程を詳細に検索して効果的な器官再生方法を確立する。

3. 研究の方法

- (1) マウス iPS 細胞による免疫不全マウスにおける奇形種形成

理研Cell Bankから供与されたマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17) を、feeder 細胞 (SL10 細胞) 上で培養した。未分化状態の確認は Nanog-GFP の発現にて行った。トリプシン / EDTA にて細胞を剥離し、細胞数を測定した後、さまざまなスキャホールドに細胞を播種して免疫不全マウス (KSN/Slc nude mouse) の背側腹部皮下に移植した。移植後1、2、3、4週で奇形種を摘出し、組織学的解析を行った。

- (2) アメロゲニン、DSP 発現レポーターベクターの構築

アメロゲニン、DSP のプロモーター領域をマウス total RNA より RT-PCR にてクローニングし、ルシフェラーゼレポーターベクターに組み込んだ。

- (3) iPS 細胞由来奇形種における組織解析
摘出した奇形種は、4% PFA 固定後、通法により、凍結またはパラフィン切片を作製、H-E 染色、免疫染色を行った。

- (4) iPS 細胞由来神経堤細胞からの骨芽細胞分化誘導

マウス iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導は2012年に我々が報告した手法により行っ

た(Otsu et al. Stem cells & Development, 2012)。さらに単離した神経堤細胞を骨分化誘導培地(mouse mesenchymal stem cell functional identification kit, R&D)にて骨芽細胞へ分化させた。4週間後の細胞はアリザリンレッド染色、Osteopontin免疫染色、骨マーカー遺伝子(Osterix, osteocalcin, osteopontin, BMP2, BMP4)に対する real time RT-PCR を行い、分化を確認した。

(5) Sp-6 発現ベクターの構築と奇形種への遺伝子導入

Sp-6 遺伝子をマウス total RNA より RT-PCR にてクローニングし、turbo-GFP 発現ベクター(Origene)に組み込んだ。iPS 細胞移植後 4 週間で形成された奇形種に種々のトランスフェクション試薬、エレクトロポレーションにて遺伝子導入を行った。

4. 研究成果

平成24年度は奇形腫の成長過程をより詳細に検索し歯の幹細胞が発生する時期を特定すること、in vitroにおけるiPS細胞の分化能を明らかにすることを目標として(1) iPS細胞のヌードマウスへの移植条件についての検討(2)歯胚発生イメージング用のiPS細胞の作製(3)奇形種内の幹細胞マーカー発現変化の解析(4) iPS細胞から間葉系幹細胞への分化誘導法の確立と骨分化能の解析を行った。平成25年度は奇形種内に特異的に上皮幹細胞を増殖、発現させるために(5) 上皮特異的遺伝子(転写因子)sp-6の奇形種内への遺伝子導入を行った。

(1) iPS細胞移植にもちいるスキャホールドとしてコラーゲングル、コラーゲンスポンジ、ゼラチン、マトリゲルなどを用いた。その結果、コラーゲングルが最も再現性よく奇形種を作製することがわかった。移植するiPS細胞数に関しては、実験期間(4週間)にもっとも

適した細胞数が 1×10^6 個であることがわかった(図3)。

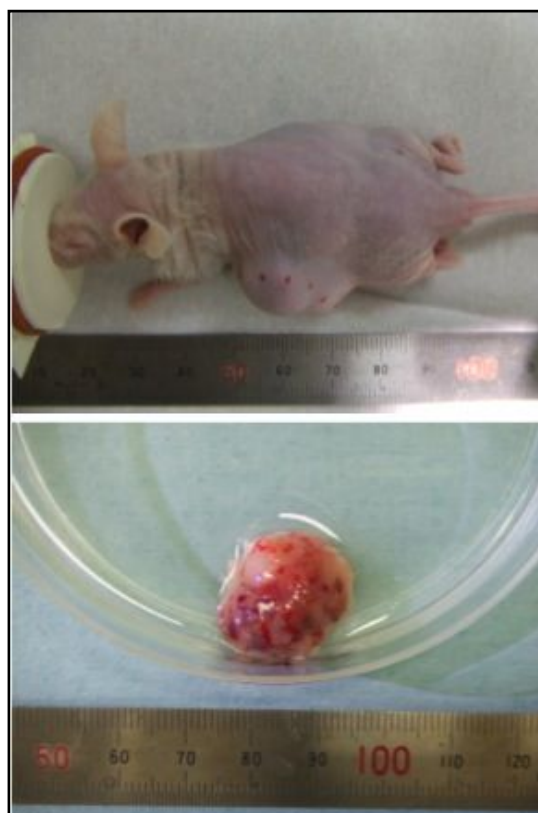


図3 iPS細胞奇形種

上:コラーゲンスポンジに 1×10^6 のiPS細胞を播種し移植した。4週間後のマウス。
下:摘出した奇形種

(2)エナメル芽細胞特異的遺伝子:アメロゲニンと、象牙芽細胞特異的遺伝子:DSP(dentin sialoprotein)プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子(pGL3ベクター)をつないだプラスミドを作製、大腸菌にて増幅した後抽出を行った。

(3)奇形種内における上皮幹細胞マーカー(CK14, p63, CD49f)の発現を、iPS細胞移植後4週までの奇形種で探索した。

CK14(cytokeratin 14)は、タイプI(酸性)ケラチンに分類され、上皮基底層に存在する上皮幹細胞や、歯胚におけるエナメル上皮幹細胞に発現している。iPS細胞由来奇形種の形成過程では、およそ細胞移植から2週間後から、腫

瘍内の上皮塊構造物、多列線毛上皮、重層扁平上皮においてその発現が認められた。

p63はガン抑制遺伝子（転写因子）p53のホモログであり、胎児の上皮、口腔粘膜上皮や歯胚上皮に発現し、上皮幹細胞マーカーとして知られている。iPS細胞由来奇形種では、細胞移植2週間後から、腫瘍内の上皮塊構造物、多列線毛上皮、単層扁平上皮、重層扁平上皮においてその発現が認められた。

CD49fはインテグリン α 6サブユニットであり、口腔粘膜上皮基底層細胞の細胞表面に発現して基底膜のラミニン-5との結合に寄与している。また、歯胚やげっ歯類切歯のエナメル上皮幹細胞でも発現しており、エナメル上皮幹細胞維持との関連も示唆されている。われわれのiPS細胞由来奇形種では、移植後1週間後から上皮塊構造物、多列線毛上皮、単層上皮、重層上皮の中に発現が認められた。

以上の結果から、iPS細胞由来奇形種の中には、エナメル上皮幹細胞となりうる細胞が存在することが示唆された。

(4) iPS細胞から神経堤細胞への分化誘導法を確立し、その分化能を検討した。

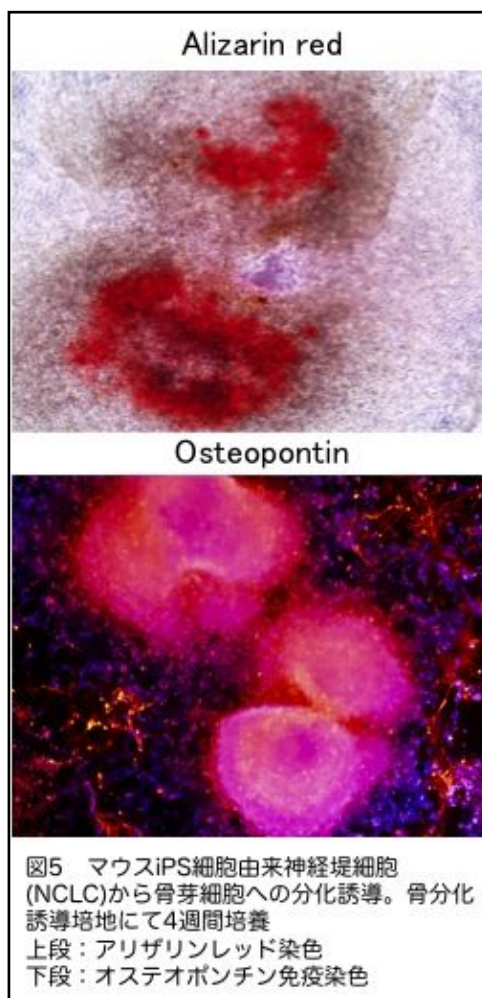
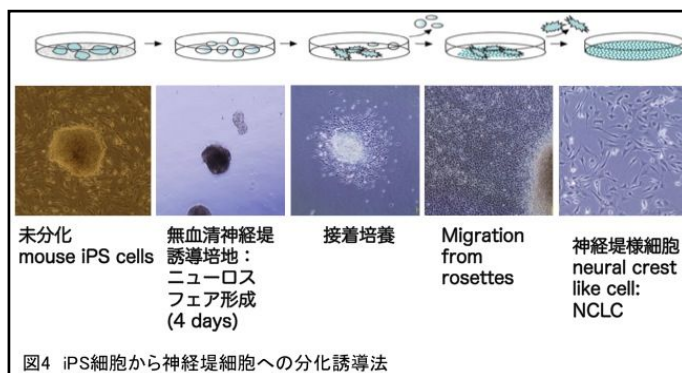
マウス iPS 細胞は、神経分化誘導培地にて2日間浮遊培養を行うと凝集塊(neural sphere)を形成し、さらにこの凝集塊を接着培養すると、周りから星形をした細胞が遊走してくる。この細胞を単離、継代培養することで神経堤細胞(NCLC)を樹立することができる。我々は以前この細胞が歯原性間葉細胞に分化し、さらに象牙芽細胞へ分化することを報告した(Otsu et al. Stem cells & Development, 2012 図4)。

本研究ではこの iPS 細胞由来が骨に分化する能力を有しているかを検討した。

単離した NCLC を骨分化誘導培地で4週間培養すると、アリザリンレッド陽性、オステオポンチン陽性細胞が出現した(図5)。

また、RT-PCR においても、骨芽細胞マーカー

遺伝子の発現上昇が見られた。さらに NCLC を歯胚間葉細胞と混ぜ、免疫不全マウスに移



植したところ、歯胚形成とともに骨の形成も認められた。以上の結果より、iPS細胞由来神経堤細胞は骨芽細胞へと分化する能力を有していることが明らかとなった。現在、この細胞をマウス頭蓋骨欠損部へ移植し、骨修復能があるかを検討中である。

(5) iPS細胞奇形種内に特異的に上皮幹細胞を増殖させることを目的に、iPS由来奇形種に対してSp-6遺伝子の強制発現実験を行っ

た。Sp-6は転写因子Sp familyの1つで、long typeとshort typeに大別できる。前者はコピキタスに発現する一方、後者は組織特異的に発現し、特にSp-6は歯胚、毛包、四肢に局在する。よって我々はSp-6遺伝子を強制発現させることで、歯胚特異的上皮細胞を選択的に誘導することができるのではないかと考えた。導入するSp-6ベクターにはGFP遺伝子が組み込まれており、遺伝子導入効率はGFPの発現にてモニタリングした。さまざまな遺伝子導入試薬とエレクトロポレーションを行い、遺伝子導入効率を比較したところ、Xfect transfection reagent(Clonetech)が最も効率よく遺伝子導入できることがわかった。そして、遺伝子導入後4週間後の奇形種の組織解析を行ったところ、興味深いことに、その中に肺胞様構造が多く見られることがわかった。また、この上皮組織の周囲には血管マーカーCD31, KL-1, endomucin陽性細胞が多く存在しており、機能的な肺構造が誘導されている可能性が示唆された(図6)。しかし一方で、この奇形種の中に歯胚様構造物は見られず、この実験条件からは歯原性上皮を選択的に誘導することはできなかった。今後さらなる実験条件の検討や、分子生物学的な解析を行い、今回得られた結果の原因について解明する予定である。

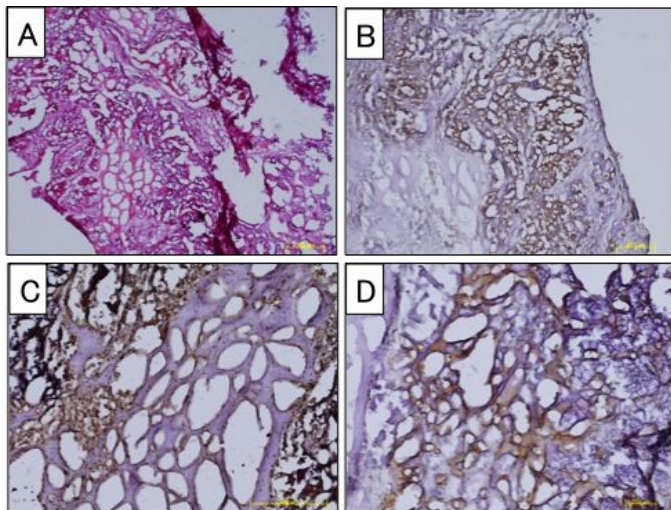


図6 マウスiPS細胞由来奇形種にSp-6遺伝子導入を行い4週間後の組織解析
A: H-E染色、B: CD31免疫染色、C: CK18免疫染色、D: Endomucin免疫染色

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)

1. Stem cell sources for tooth regeneration: Current status and future prospects. Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, Harada H. *Frontiers in Physiology* 5: 36. 2014. Doi: [10.3389/fphys.2014.00036](https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00036)
2. Frontier dental research on iPS cells. Arakaki M, Egusa H, Otsu K, Saitoh I, Miura T, Harada H. *Journal of Oral Biosciences*. 55:4:159-164. 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2013.08.002>
3. Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. Otsu K, Kishigami R, Oikawa-Sasaki A, Fukumoto S, Yamada A, Fujiwara N, Ishizeki K, Harada H. *Stem Cells Dev*. 1;21(7):1156-64. 2012 Doi: [10.1089/scd.2011.0210](https://doi.org/10.1089/scd.2011.0210).
4. Histological analysis of epithelial stem cells during induced pluripotent stem cell-derived teratoma development. Kishigami R, Otsu K, Oikawa-Sasaki A, Fujiwara N, Ishizeki K, Tabata Y, Harada H. *J Oral Bioscience*, 54, 1, 58-65, 2012. DOI: [10.1016/j.job.2012.01.006](https://doi.org/10.1016/j.job.2012.01.006)

[学会発表](計 8 件)

1. Differentiation of induced

- pluripotent stem cells into odontogenic lineage for tooth regeneration. Otsu K, Sakano M, Fujiwara N, Harada H. Kyudai Oral bioscience, Fukuoka, Feb. 28th~March 1st, 2014
2. Differentiation of iPS cells into odontogenic cells. Otsu K, Sakano M, Masuda T, Fujiwara N, Harada H, CDB symposium 2014 Regeneration of Organs; Programming and Self-organization, Kobe, March 10th~12nd, 2014
 3. Differentiation of iPS cells into odontogenic cells. Otsu K, Sakano M, Fujiwara N, Harada H, XXIII International Symposium on Morphological Sciences. Niigata, Japan. Semtember 10th~12nd, 2013
 4. iPS細胞を用いた歯胚組織発生 坂野深香、大津圭史、藤原尚樹、原田英光 第13回 日本再生医療学会総会 京都 2014年3月4日~6日
 5. iPS細胞を用いた歯胚組織再生 坂野深香、大津圭史、藤原尚樹、原田英光 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山 2013年9月20日~23日
 6. iPS細胞における神経堤由来細胞への分可能 大津圭史、菊池和子、坂野深香、増田智幸、藤原尚樹、原田英光 第12回 日本再生医療学会総会、横浜 2013年3月21日~23日
 7. iPS細胞から象牙芽細胞への分化誘導技術の開発と歯の再生への応用 大津圭史 第54回歯科基礎医学会学術大会、郡山 2012年9月14~16日
 8. iPS細胞から歯原性間葉細胞への分化誘導 大津圭史、原田英光、藤原尚樹 第11回日本再生医療学会総会、横浜 2012年6月12日~14日

〔図書〕(計 3 件)

1. iPS細胞から歯原性間葉細胞間葉細胞への分化誘導. 再生医療における臨床研究と製品開発 大津圭史 技術情報協会 p191-194, 2014年
2. 幹細胞 (Stem cell) 研究がひらく歯の再生の扉 大津圭史、藤原尚樹、原田英光 日本歯科評論 72(8), 9-11、2012
3. iPS細胞から神経堤細胞への分化誘導法の確立 大津圭史、藤原尚樹、原田英光 DENTAL DIAMOND 541; 37, 92-95 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 和子 (KIKUCHI, Kazuko)
 岩手医科大学 歯学部 助教
 研究者番号：40326690

(2)研究分担者

藤原 尚樹 (FUJIWARA, Naoki)
 岩手医科大学 歯学部 准教授
 研究者番号：20190100

大津 圭史 (OTSU, Keishi)
 岩手医科大学 歯学部 助教
 研究者番号：60509066