研究者：新垣真紀子（所属：東北大学病院小児歯科）

研究題目：人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を用いた歯原性細胞分化誘導法の開発

目　的：

現在，歯科領域においては，う蝕や歯周病，口腔領域外傷などの歯科疾患により損傷を生じた歯に対して人工材料を用いた修復治療が主に行われており，歯の細胞や組織の再生を応用した治療技術は確立していない。

歯の発生は，歯胚発生の初期段階から，口腔上皮由来の歯原性上皮細胞と神経堤由来の間葉細胞間におけるシグナル分子群の連続した相互作用により，複雑に形態形成が制御されている。マウスモデルにおいては，器官原器法により複数のマウス胎仔より調整した歯原性細胞を用いた人工歯胚再構築が可能となっている。しかしながら，ヒトの歯の再生医療として人工細胞や人工歯胚再構築を応用するには，自家移植可能でかつヒトの歯冠を形成するのに十分な数の歯原性細胞を調整・調達する必要がある。歯原性細胞には，エナメル芽細胞や象牙芽細胞など歯の発生段階により様々な種類の細胞が含まれる。中でも，エナメル質を形成するエナメル芽細胞は歯の萌出後に消失し，成人の体内には存在しない為，その分化機序や細胞機能解析は十分に行われておらず，その誘導法も確立していない。

本研究室ではこれまでに，エナメル芽細胞の分化維持には，エナメル芽細胞が分泌する細胞外基質の１つであるアメロブラスチン（AMBN）が重要な役割を演じていることを明らかにしている。そこで，再生歯科医療および歯の発生機序解明に必要な細胞源として，自己複製能と多分化能を有する人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を用いて，エナメル芽細胞を含めた歯原性細胞を高効率に分化誘導するシステムの開発を本研究の目的とした。

方　法：

歯原性上皮細胞と間葉細胞の上皮－間葉相互作用を応用し，歯原性上皮細胞と人工多能性幹細胞（iPS 細胞）とを相互作用させることにより，iPS 細胞をエナメル芽細胞に分化誘導することが可能か実験を行った。分化誘導には，ラット歯胚由来の歯原性上皮細胞株 SF2 の中でも，エナメル芽細胞の細胞外基質であるアメロブラスチン（Ambn）を最も高く発現している SF2-24 細胞を用いた。分化誘導方法として SF2-24 細胞を敷石状に培養した後に増殖を停止させ，その上にマウス由来 iPS 細胞を培養する共培養系を行った。

iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化を評価するため，以下の２つの解析方法を行った。

①RT-PCR 法；エナメル芽細胞の分化マーカーである Ambn およびエナメリン（Enam），上皮細胞のマーカーである p63 およびサイトケラチン 14（CK14）の iPS 細胞における経時的な発現変化を解析

②細胞免疫染色法；抗アメロブラスチン抗体を用い，iPS 細胞における AMBN 局在をタンパクレベルで確認

また，iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化過程における誘導因子の同定法として，Ambn 低発現歯原性上皮細胞株と iPS 細胞の共培養を行うとともに，SF2-24 細胞の培養上清を用いた SF2-24 conditioned medium（CM）による iPS 細胞分化誘導系に，神経栄養因子の 1 つである NT-4 に対する抗 NT-4 抗体を添加して iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化を検討した。

結果および考察：

iPS 細胞は，細胞が凝集したコロニー形態で増殖する。ラット由来歯原性上皮細胞 SF2-24 上でマウス由来 iPS 細胞を共培養した結果，培養 4 日目で細胞間が不明瞭であった iPS 細胞（図 1A）は，培養 6 日目で細胞塊の周囲から，細胞境界が明瞭な細胞が形成され（図 1B），培養 10 日目ではそれらの細胞は上皮細胞に類似した敷石状の形態を有していた（図 1C）。

iPS 細胞と SF2-24 との共培養 7 日目と 10 日目において，マウス iPS 細胞におけるエナメル芽細胞の分化マーカーの発現を RT-PCR 法にて確認した結果，Ambn と Enam の発現が経時的に増加していた。また上皮細胞のマーカーである p63 や CK14 の発現増加も認められた（図 2）。

共培養 14 日目に，iPS 細胞塊から分化した細胞集団におけるアメロブラスチンのタンパク局在を，抗アメロブラスチン抗体を用いた免疫染色で確認した結果，分化した iPS 細胞の約 95% がアメロブラスチン陽性細胞となっていた（図 3）。この結果から，iPS 細胞とエナメル芽細胞との共培養により，iPS 細胞が一部エナメル芽細胞に分化したことが明らかとなった。

また，ラット由来歯原性上皮細胞株 SF2 のうち，アメロブラスチン低発現細胞と iPS 細胞との共培養では上皮細胞様細胞への分化は見られたが，iPS 細胞由来 Ambn の発現は認められなかった（date not shown）。また，SF2-24CM による iPS 細胞培養では，共培養時と同様にエナメル芽細胞マーカーの経時的な発現が認められた。しかし，CM に抗 NT-4 抗体を加えて培養した結果，添加しない場合と比べて CK14 の増加は認められたが Ambn の発現は減少していた（図 4）。

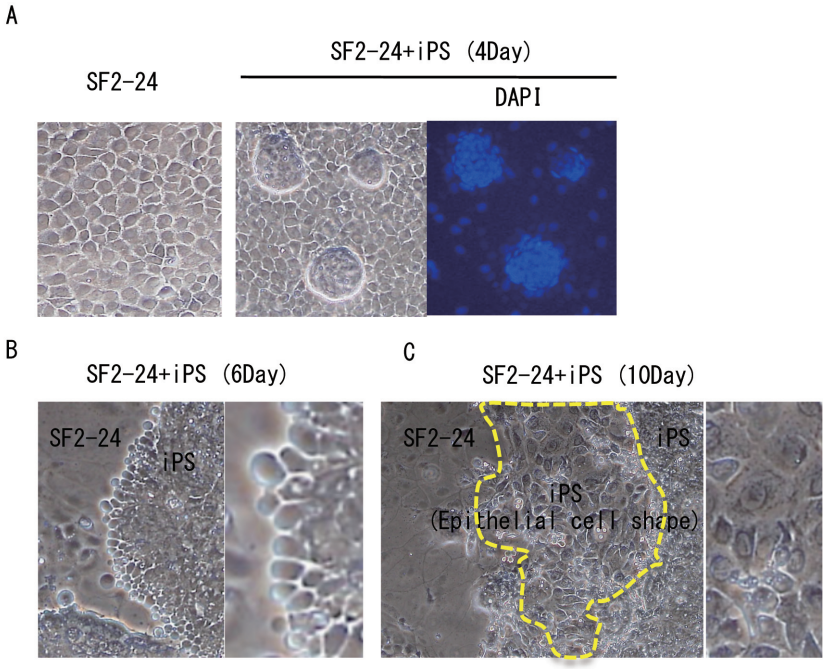


図 1　位相差顕微鏡像

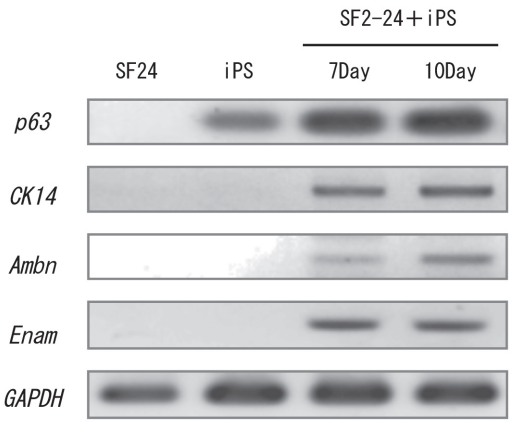


図２　RT-PCR

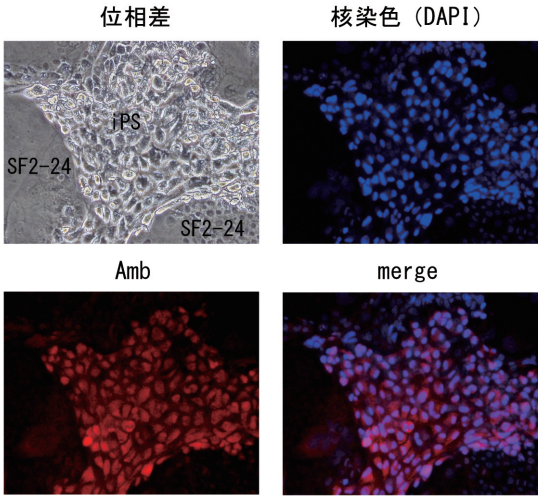


図３　細胞免疫染色

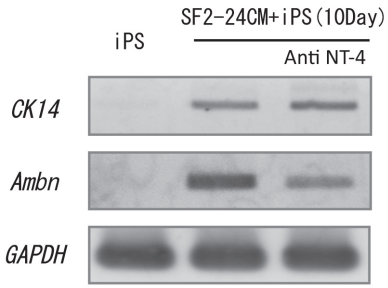


図４　RT-PCR

本結果より，iPS 細胞とエナメル芽細胞の共培養ならびに conditionedmedium（CM）培養により，iPS 細胞がエナメル芽細胞に分化可能であることが示され，その分化誘導因子として，分化誘導に用いた細胞から分泌される NT-4 や Ambn が重要な役割を演じていることが示唆された。

現在，他の研究グループとの共同実験により，マウス由来 iPS 細胞から象牙芽細胞の分化誘導にも成功している。今後は，細胞外マトリックスや増殖因子を用いて iPS 細胞から高効率に歯原性細胞を分化誘導する方法を確立するとともに，エナメル芽細胞の分化機序や機能解析，iPS 細胞由来の歯関連細胞からエナメル質や象牙質の再生および人工歯胚再構築が可能か検討を行っていきたいと考えている。

成果発表：

本研究は下記の論文として投稿し，受理されている。

Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation.

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S.

The Journal of Biological Chemistry, 2012.［in press］