

氏名(本籍) : 新垣真紀子

学位の種類 : 博士(歯学) 学位記番号 : 歯博第581号

学位授与年月日 : 平成23年3月25日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : 人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いたエナメル芽細胞誘導法の確立

論文審査委員 : (主査) 教授 福本 敏  
教授 山本 照子 教授 鈴木 治

## 論文内容要旨

複雑でかつ繊細な形態形成を伴う歯の発生は、上皮および間葉の両組織を構成する由来の異なる複数の細胞群による相互作用が必要である。また、歯の発生が完了すると、エナメル基質産生に必要なエナメル芽細胞は消失してしまう。歯の再生医療を考えた場合、利用可能な細胞の供給源が、成人に存在しないという課題を乗り越える必要がある。近年、成人体細胞へ4つの遺伝子導入することでES細胞に類似した無限の増殖能、多分化能を有する人工多能性幹細胞(iPS細胞)が開発された。本研究では、iPS細胞をエナメル芽細胞へ分化誘導することが可能であるかを検討した。

これまでに、申請者の研究室は、アメロブラスチンがエナメル芽細胞の分化維持に重要な役割をもつことを明らかにしてきた。今回、マウス由来iPS細胞とラット由来のアメロブラスチン遺伝子(*Ambn*)を発現している歯原性上皮細胞株との共培養系を考案し、iPS細胞を用いたエナメル芽細胞分化誘導法の確立を試みた。初めに、*Ambn*を高発現するラット歯胚由来の歯原性上皮細胞株SF24を樹立した。エナメル芽細胞が分化の初期段階から分泌するエナメル基質がアメロブラスチン(AMBN)であることから、iPS細胞がエナメル芽細胞へ分化誘導された分化マーカーとして*Ambn*を用い、iPS細胞における経時的な遺伝子発現変化を比較検討した。その際、ラットcDNAに混在するマウスiPS細胞由来の*Ambn*のcDNAを特異的に検出するため、マウス*Ambn*の相補的核酸に高い親和性と特異性を持ち結合するlocked nucleic acid(LNA)プライマーを作製した。

マウスiPS細胞と共培養する際、マイトマイシンC処理にて増殖を停止させたSF24をフィーダーとして用いた。共培養の結果、培養6日目に検鏡下において、iPS細胞集団の境界から上皮細胞に類似した形態を呈する細胞が出現した。共培養7日目にはiPS細胞が*Ambn*およびエナメルリン(*Enam*)を発現し、また、歯原性上皮細胞の他のマーカーである*p63*および*CK14*も発現誘導されていることを確認した。さらに、共培養14日目の細胞を、マウスAMBN特異抗体を用いて免疫細胞化学的に検討した結果、AMBN陽性のiPS細胞集団が局在していた。このことから、本培養系によってiPS細胞が歯原性上皮細胞へと分化誘導されたことが遺伝

子および蛋白レベルで確認された。一方、幹細胞のマーカーである *Klf4* や *Sox2*, *Oct3/4*, *Nanog* は共培養期間を通して発現に変化が認められなかった。この結果は、多分化能をもつ iPS 細胞が、SF24 細胞と共培養することにより局所的にエナメル芽細胞へ分化誘導されたことを示している。

本研究により、iPS 細胞をエナメル芽細胞に分化させることに成功し、異種間の分化誘導が可能であることが証明され、iPS 細胞が歯の再生医療において有用な細胞供給源となる可能性が示唆された。

## 審 査 結 果 要 旨

歯の発生は、上皮および間葉の複数の細胞群が、連続的に相互作用することで形態形成が行われていく。また、それらの細胞群の中でも、歯の発生が完了するとエナメル質を形成するエナメル芽細胞は消失してしまう。歯の再生医療を考えた場合、利用可能な細胞の供給源が、成人に存在しないという課題を乗り越える必要がある。近年、成人体細胞へレトロウイルスによって4つの遺伝子導入することでES細胞に類似した無限の自己複製能、多分化能を有する人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が開発され、細胞を大量培養し目的とする組織や細胞へ分化させることができる可能性が示されている。また、ES細胞においては、歯原性上皮様細胞へ誘導したとする報告もされてきている。本研究では、iPS細胞をエナメル芽細胞へ分化誘導することが可能であるかを検討している。

これまでに、申請者の研究室は、アメロブラスチンがエナメル芽細胞の分化維持に重要な役割をもつことを明らかにしてきた。本研究では、iPS細胞とアメロブラスチンを発現している歯原性上皮細胞株との共培養系を用いたiPS細胞分化誘導法の確立を試みている。共培養後の細胞分化検定を可能にするため、ラット歯胚由来のアメロブラスチン高発現エナメル芽細胞株 SF24 を利用し、マウス由来のiPS細胞をエナメル芽細胞に誘導する方法を考案しているところが特徴的である。iPS細胞がエナメル芽細胞へ分化誘導された指標としてアメロブラスチン遺伝子を用い、RT-PCR法にてiPS細胞における経時的な遺伝子発現変化を比較検討しているが、その際、ラットcDNAに混在するマウスiPS細胞由来のアメロブラスチンのcDNAを特異的に検出し、ラット細胞由来のアメロブラスチンのcDNAの非特異的な増幅を防ぐため、マウス AMBN の相補的核酸に高い親和性と特異性を持ち結合する locked nucleic acid (LNA) プライマーを作製することで、マウスiPS細胞の分化を評価可能にしている。

マイトマイシンC処理することによって増殖を停止させたSF24をフィーダーとして用い、マウスiPS細胞を共培養した結果、培養6日目に検鏡下において、iPS細胞集団の境界から上皮細胞に類似した形態を呈する細胞が出現している。共培養7日目にはiPS細胞がアメロブラスチン遺伝子を発現していることがRT-PCR解析にて確認された。さらに蛋白レベルでは、共培養14日目にマウスアメロブラスチン特異抗体を用いて、免疫細胞化学的検討を行った結果、アメロブラスチン陽性のiPS細胞集団が局在していた。同時に、歯原性上皮細胞の他のマーカーであるp63もiPS細胞において発現誘導されている。従って、本培養系によってiPS細胞が歯原性上皮細胞へと分化誘導されたことが確認された。一方、幹細胞のマーカーである*Klf4* や *Sox2*, *Oct3/4*, *Nanog* は共培養期間を通して発現に変化が認められなかった。この結果は、未分化なiPS細胞が混在して、SF24と共培養することにより局所的にエナメル芽細胞様の細胞が分化誘導されたことを示している。また、今後、共培養を継続することで分化したiPS細胞によって未分化な状態のiPS細胞が連鎖的にエナメル芽細胞へ分化誘導されていく可能性が示されている。以上の結果から、iPS細胞をエナメル芽細胞に分化させることに成功し、種を越えて分化誘導が可能であることが証明された。本研究の更なる発展により、iPS細胞が歯の再生に必要な細胞供給源となりうる可能性が示唆された。

以上の研究はiPS細胞由来の歯原性上皮細胞、エナメル芽細胞の分化誘導法の開発に貢献し、歯の再生研究の発展に寄与することが期待される。従って、本論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと判断する。