



東北大学

報道機関各位

平成24年2月10日
東北大学大学院歯学研究科

iPS細胞からエナメル質をつくる細胞を誘導 ～歯の再生への応用が期待～

【ポイント】

- ・ 歯のエナメル質をつくる細胞（エナメル芽細胞）は、歯の萌出後に失われる
- ・ iPS細胞からエナメル芽細胞を世界で初めて誘導
- ・ エナメル芽細胞の分化機序解明や、歯の再生への細胞ソースとして利用可能

【概要】

国立大学法人東北大学は、幹細胞が上皮細胞との相互作用により、どのような細胞運命をたどるかを解明する過程で、人工多能性幹細胞（iPS細胞）から、エナメル質をつくるエナメル芽細胞の誘導に成功しました。これは東北大学病院の新垣真紀子医員、歯学研究科の福本敏教授らと、米国国立衛生研究所、岩手医科大学、東京理科大学との共同研究による成果です。

私たちの歯はエナメル質と象牙質よりつくられており、その中でもエナメル質は体の中で最も硬い組織です。象牙質をつくる象牙芽細胞は歯を形成した後も歯髄の中に存在し続けますが、エナメル芽細胞は、歯が萌出（生える）すると、体の中に存在しなくなります。このためエナメル芽細胞がどのように分化し機能を維持しているのか明らかでなく、そのメカニズム解明や、これらの細胞を歯の再生に応用する為には、マウスの胎児を利用しなければなりません。

今回、研究グループは、ラット由来の歯原性上皮細胞とマウス由来 iPS 細胞を共培養することで、iPS細胞がエナメル基質であるアメロブラスチン、エナメルリン（エナメル芽細胞マーカー）を発現することを確認しました。また、この分化過程において分化誘導に用いた細胞から分泌される NT-4（神経栄養因子の1つ）やアメロブラスチンが重要な役割を演じていることを明らかにしました。この成果は、今まで困難であったエナメル芽細胞の役割を明らかにすること、さらには歯の再生の為の細胞ソースとして応用可能な新しい技術です。

本研究成果は、米国の科学雑誌「*The Journal of Biological Chemistry*」電子版に掲載されました。

【背景】

歯はエナメル質、象牙質、セメント質の3つの硬い組織から構成されます。この中でエナメル質は、生体内で最も硬い組織であり、人が食生活を営む上できわめて重要な役割を持ちます。これまでエナメル質は、一旦齲蝕（むし歯）などで破壊されると、再生させることは不可能であり、人工物による修復しかできませんでした。そこで、エナメル質をつくるエナメル芽細胞の培養や、その分化制御法の開発が望まれておりました。象牙質をつくる象牙芽細胞やその前駆細胞は、一生涯歯の中の歯髄に存在し続けますが、エナメル芽細胞は、歯が萌出（生える）すると、体の中には存在しない細胞となってしまう、この細胞の分化機能の解明や、歯の再生技術開発のためには、マウスの胎児組織を用いた方法しか存在しませんでした。

また、歯は歯胚と呼ばれる小さな原基から形成されますが、この歯胚は口腔内の上皮細胞（歯原性上皮細胞）と、神経堤由来の間葉細胞との相互作用（上皮—間葉相互作用*¹）により形成されることが知られております。そこで、研究グループでは、歯の発生メカニズムを解明する目的で、この歯原性上皮細胞と様々な幹細胞とを相互作用させることで、幹細胞がどのような運命をたどるのかを解明することを目的に研究を開始しました。

【研究成果】

幹細胞と歯原性上皮細胞の相互作用を見る為に、1) 人工多能性幹細胞（iPS細胞）、2) 歯髄幹細胞、3) 歯髄細胞の3種類の細胞を用いました。

ラットの歯胚由来の歯原性上皮細胞株（SF2-24細胞）を敷石状に培養した上に、マウス由来 iPS 細胞を撒くと、iPS 細胞は歯原性上皮細胞上で、細胞が凝集した小さな塊を形成しました（図1A）。この細胞塊は、それぞれの細胞と細胞の間が不明瞭な細胞塊でした。培養を6日間継続すると、この細胞塊の周囲から、細胞の境界が明瞭な細胞が形成され（図1B）、さらに培養後10日目では、伸びだしてきた細胞は上皮細胞に類似した敷石状の形態を有していました（図1C）。

このラット由来歯原性上皮細胞と、マウス由来 iPS 細胞との共培養の結果、iPS 細胞におけるエナメル基質*²（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、アメロブラスチン、エナメリンの発現が経時的に増加することを見いだしました（図2A）。また上皮細胞分化の指標である p63 やサイトケラチン 14 の発現増加も認められました（図2A）。そこで、iPS 細胞

の細胞塊から伸びだしてきた細胞集団が、エナメル芽細胞の分化マーカーを発現しているかを、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、iPS 細胞の約 95%がアメロブラスチン陽性細胞となっていました (図 2 B)。

また、同様の方法で歯髄幹細胞 (SP 細胞^{*3})、歯髄細胞 (MP 細胞) を歯原性上皮細胞と共培養すると、歯髄幹細胞は、象牙質シアロリン蛋白質^{*4} (象牙芽細胞のマーカー) を発現する細胞に分化しましたが、歯髄細胞は全く分化しませんでした (図 3)。

本研究の成果より、ラット歯原性上皮細胞株と共培養を行なうことでマウス由来 iPS 細胞をエナメル芽細胞へ分化誘導することが可能となりました。

本研究で用いたマウス由来 iPS 細胞は、京都大学の山中教授らが作製したものを、理研バイオリソースセンターより分与を受けたものです。

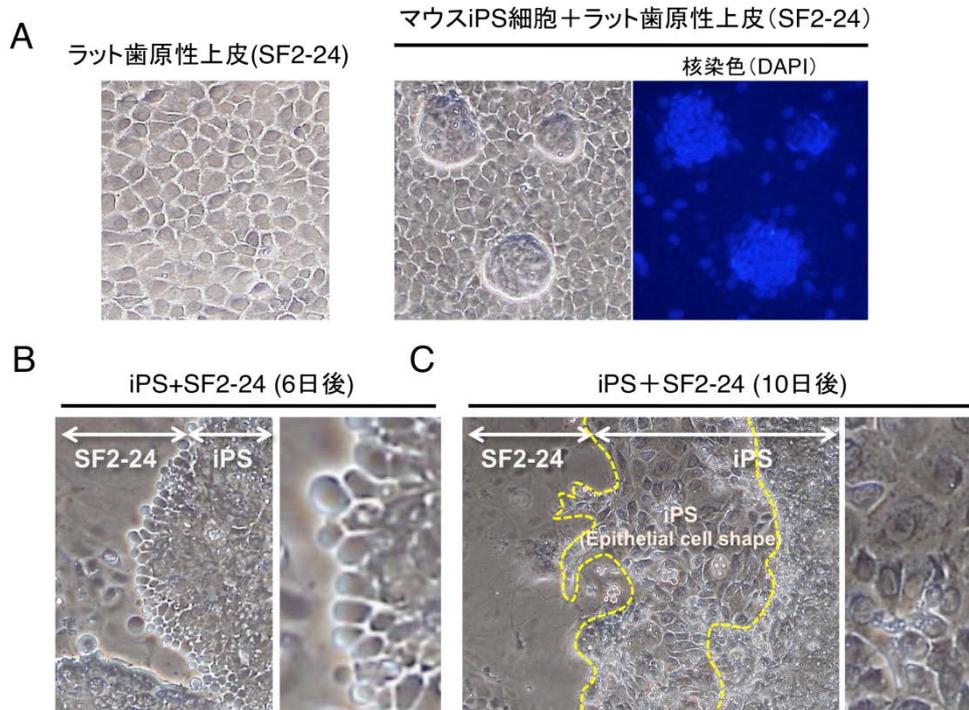
【今後の展開】

岩手医科大学の原田英光教授の研究グループとの共同研究により、マウス由来 iPS 細胞から、象牙質を形成する象牙芽細胞の分化誘導に成功しています。今回得られた細胞との組み合わせにより、全身のどこの細胞からも、歯を作り出せる可能性が生まれたと考えられます。今後、iPS 由来の歯関連細胞から、歯を形成しうるかどうかの検討を行なうとともに、今までブラックボックスであったエナメル芽細胞の分化メカニズムや機能評価、さらにはエナメル質再生に関する研究へと発展させたいと考えております。

* 本研究の成果は、独立行政法人に本学術振興会の最先端・次世代研究開発支援プログラム「かたちに関わる疾患解明を目指した歯の形態形成メカニズムの理解とその制御法の開発」(研究代表者：福本敏 東北大学大学院歯学研究科教授) によるものです。

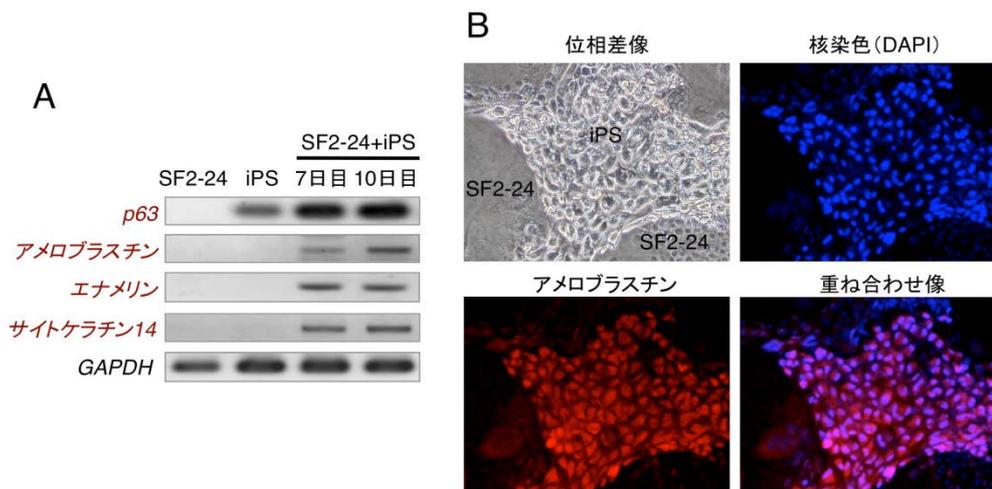
【図および説明】

図1



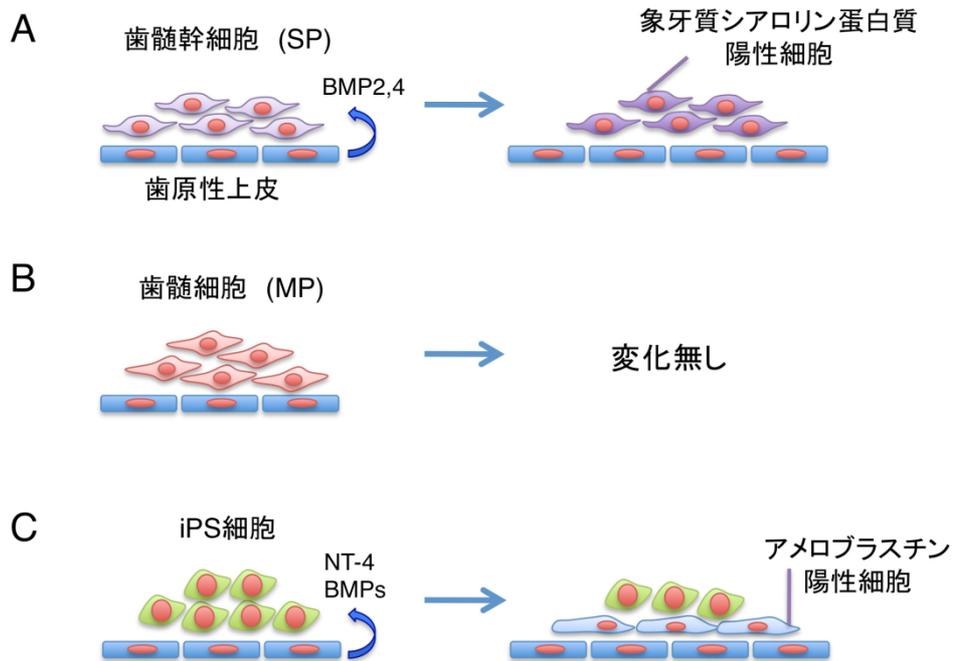
(A)ラット由来歯原性上皮細胞株(SF2-24細胞)は、敷石状の細胞形態を有する。この細胞上に、マウス由来iPS細胞を培養すると、円形の細胞塊を形成する。(B)2種類の細胞を6日間培養すると、iPS細胞の周囲から細胞の境界が明瞭な細胞が伸びだしてきた。(C)共培養後10日目では、iPS細胞から伸びだしてきた細胞は、上皮細胞に類似した細胞形態へと変化した。

図2



(A)ラット由来歯原性上皮細胞株(SF2-24細胞)と、マウスiPS細胞をとも培養し、iPS細胞に発現する遺伝子についてRT-PCR法にて解析した結果、エナメル芽細胞マーカーであるアメロブラスチン、エナメルリンの発現増加が認められた。さらに上皮細胞のマーカーであるp63、サイトケラチン14の遺伝子発現上昇を認めた。(B)iPS細胞から伸びだしてきた上皮様の細胞を抗アメロブラスチン抗体で免疫染色を行なった結果、iPS細胞の約95%が、アメロブラスチン陽性であった。

図3



(A)ラット由来歯原性上皮細胞株(SF2-24細胞)と、歯髄幹細胞(SP細胞)を共培養すると、歯髄幹細胞は象牙質シアロリンタンパク質(象牙芽細胞マーカー)陽性の細胞へと分化する。(B)一方、ラット由来歯原性上皮細胞株と歯髄細胞(MP細胞:既に分化している細胞)を共培養すると、歯髄幹細胞は、象牙芽細胞やエナメル芽細胞には分化しない。(C)ラット由来歯原性上皮細胞株とマウスiPS細胞を共培養すると、アメロラスチン陽性の細胞へと分化する。

【用語の説明】

* 1 上皮—間葉相互作用

多くの器官は、上皮細胞と間葉細胞との相互作用により形成される。この相互作用は、おもに相互の細胞から分泌される細胞増殖因子や基質によりおこなわれ、器官の概形や大きさの決定重要であると考えられている。歯以外にも唾液腺、毛、乳腺などが上皮—間葉相互作用により形成され、また類似の発生は肺や腎臓でも認められる。

* 2 エナメル基質

エナメル質の形成に関わる細胞外基質（マトリックス）の総称である。代表的な分子として、アメロジェニン、アメロブラスチン、エナメルリンなどがある。アメロブラスチンは、本研究グループがその機能解明を行い、エナメル芽細胞の細胞接着や増殖制御に関わっていること報告した(Fukumoto S et al. *J Cell Biol* 2004)。

* 3 歯髄幹細胞（SP 細胞）

歯髄の中には、0.2-1.0%の幹細胞が存在し、これを歯髄幹細胞という。この細胞は、神経細胞や骨芽細胞、象牙芽細胞、脂肪細胞などのさまざまな細胞に分化することが可能であり、再生医療への応用が期待されている。本研究では、マウス由来歯髄細胞を不死化し、ヘキスト色素を細胞に取り込ませた後、色素の排出量の高い細胞集団（SP: side population）を、細胞ソーティングを用いて作製した細胞株を用いた。

* 4 象牙質シアロリン蛋白質

象牙質シアロリン蛋白質 (DSPP) は、象牙芽細胞マーカー分子の1つであり、蛋白合成後に象牙質シアロ蛋白 (DSP) と象牙質リン蛋白 (DPP) に分解され、象牙質形成に関わる。本遺伝子の変異は、象牙質形成不全症を引き起こすことが知られている。

【論文題目】

Arakaki M., Ishikawa M., Nakamura T., Iwamoto T., Yamada A., Fukumoto E., Saito M., Otsu K., Harada H., Yamada Y., and Fukumoto S. (2012) Role of epithelial –stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem.* in press.

問い合わせ先

東北大学大学院歯学研究科 小児発達歯科学分野 tel:022-717-8380

教授 福本敏

東北大学大学院歯学研究科 庶務係 tel:022-717-8244