

〔学位論文〕

マウスiPS細胞のゼラチンコート上での培養による
表皮角化細胞およびエナメル上皮細胞への分化

吉田 光希

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系 臨床口腔病理学分野

Differentiation of keratinocyte and ameloblast
on gelatin-coated culture in mouse iPS cells

Koki YOSHIDA

Division of Oral Medicine and Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : mouse iPS cells, keratinocyte, ameloblast

緒 言

人工多能性幹細胞（iPS細胞）は多分化能を有しES細胞に代わるものとして、再生医療への応用が期待されている。これまで神経や心筋などへの分化誘導についての報告は多いものの、上皮系細胞への分化誘導に関する報告は僅かである。最近になり、ES細胞と同様に、フィーダー細胞を用いたiPS細胞をレチノイン酸およびBMP-4を添加することにより表皮角化細胞へと分化することが報告された。さらに、マウスiPS細胞をラット由来歯原性上皮細胞と共培養するとエナメル上皮細胞へと分化することが報告され、歯の再生医療への応用の可能性が示されている。しかしながら、いずれの研究もフィーダー細胞を用いる為、異種細胞の混入が避けられず臨床応用には難がある。フィーダー細胞の代用としてゼラチンコートディッシュを用いた研究も行われているが、iPS細胞の上皮系およびエナメル上皮細胞への分化にフィーダーレス培養を試みた報告はみられない。そこで本研究では、ゼラチンコートディッシュを用いてマウスiPS細胞の表皮角化細胞とエナメル上皮細胞への分化誘導を試みた。

材料及び方法

1. 細胞：マウスiPS細胞（iPS-MEF-Ng-178B-5株）および、ブタマラッセ上皮様細胞（epithelial cell rests of Malassez；ERM）を用いた。
2. マウスiPS細胞の多能性（未分化状態）の確認：マウスiPS細胞の多能性は、Alkaline Phosphatase染色および未分化マーカーのNanog, Oct3/4, Sox2, Klf4 mRNA発現を半定量的RT-PCR法により確認した。
3. 胚様体の作製：胚様体の作製は、96ウェルプレート法により行った。
4. 表皮角化細胞への分化誘導：分化誘導効率を上げる為の前処置として胚様体作製時に、①Control（Dimethyl sulfoxide；DMSO、添加）群、②25 ng/ml BMP-4単独添加群、③0.1 μ M all-transレチノイン酸および25 ng/ml BMP-4の共添加群、を各条件下で添加し胚様体の作製を行った。ゼラチンコート処理したディッシュに胚様体を移し、2% ペニシリンーストレプトマイシン、10% FBS含有DMEM培地を使用し、再度上記①～③の条件下で分化誘導試薬を添加し、37℃、5% CO₂下で最長で14日間接着培養を行った。表皮角化細胞への分化状態の確認は、定量的RT-PCR法により各細胞におけるKeratin14および Δ Np63 mRNA発現量を定量的に比較した。分化誘導された表皮角化細胞の免疫組織化学的観察は、接着培養14日目の細胞を用いた。
5. エナメル上皮細胞への分化誘導：ERMがBMP-2、-4を発現しているか確認するために、培養ERMから

total RNAを抽出しブタBMP-2, -4のプライマーおよび内在性ControlとしてブタGAPDHを用いた半定量的RT-PCR法にてmRNA発現を確認した。ゼラチンコート処理したディッシュに胚様体を移し、2% ペニシリン-ストربتマイシン, 10% FBS含有DMEMにて37℃, 5% CO₂下で最長で14日間接着培養を行った。培養条件は, ①Control (DMSO添加) 群, ②胚様体とERMとの共培養群, ③ERM上清で培養した群とし, さらにBMP-2, -4による影響を調べる為にBMP InhibitorであるNogginを添加した培養条件として, ④胚様体とERMとの共培養に25 ng/ml Nogginを添加した群, ⑤ERM上清培養に25 ng/ml Nogginを添加した群も加えた。エナメル上皮細胞への分化状態の確認は, 定量的RT-PCR法により各細胞におけるKeratin 14, Amelogenin およびAmeloblastin mRNAの発現量を定量的に比較した。分化誘導されたエナメル上皮細胞の免疫組織化学的観察は, 接着培養14日目の細胞を用いた。

結 果

1. マウスiPS細胞はAlkaline Phosphatase陽性であり, 未分化マーカーであるNanog, Oct3/4, Sox2, Klf4 mRNA発現が認められ, 多能性が確認された。
2. ゼラチンコートディッシュでBMP-4単独添加もしくはレチノイン酸とBMP-4の同時添加によって, ΔNp 63およびKeratin14 mRNA発現が上昇し, ゼラチンコートディッシュを用いたフィーダーレス条件下でのマウスiPS細胞の表皮角化細胞への分化誘導が確認された。
3. 抗Keratin抗体を用いた免疫組織化学染色により, BMP-4単独添加もしくはレチノイン酸とBMP-4共添加による培養14日目の細胞にKeratin蛋白陽性細胞が多数みられ, 表皮角化細胞への分化が蛋白レベルでも確認された。
4. ERMとの共培養, もしくはERM上清培養により, AmelogeninおよびAmeloblastin mRNAの経時的な発現上昇が認められ, マウスiPS細胞のエナメル上皮細胞への分化誘導が確認された。特にERM上清により培養するフィーダーレス培養条件下の方が, よりエナメル上皮細胞へ分化し易いことが確認された。
5. 抗Amelogenin抗体を用いた免疫組織化学染色により, ERM共培養あるいはERM上清により培養した14日目の細胞に, Amelogenin蛋白陽性細胞が多数みられ, エナメル上皮細胞への分化が蛋白レベルでも確認された。
6. BMP InhibitorのNogginの添加により, 培養14日目の細胞にエナメル分化マーカーAmelogenin, Ameloblastin mRNAの有意な発現低下が認められ, エナメル上皮細胞への分化にBMPの関与していることが確認された。

結 論

以上のことから, マウスiPS細胞はフィーダーレス培養条件下において表皮角化細胞への分化が可能であることが示唆された。また, フィーダーレス条件下でのエナメル上皮細胞への分化にはERM培養上清を用いた培養が有効であることが示唆された。また, iPS細胞のエナメル上皮細胞への分化にはERMによって産生されたBMP-2, -4が少なくとも一部に関与していることが示唆された。



吉田 光希

平成18年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成25年3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成25年4月 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系 臨床口腔病理学分野 助教