

口腔粘膜歯肉由来 iPS 細胞を用いた口腔化粧品安全性評価の確立

東北大学大学院歯学研究科分子・再生歯科補綴学分野

江 草 宏

The aim of this project is to develop bioengineered safety evaluation tools for oral care reagents using patient-derived stem cells, which mimics structure and function of oral mucosa and tongue in vitro. We first generated iPS cells from human gingival fibroblasts via transduction of Oct3/4, Sox2, Klf4 without using c-Myc oncogene. By this method, gingival fibroblasts demonstrated a higher reprogramming efficiency than the skin fibroblasts, which have been conventionally used for the generation of iPS cells. We also generated dendritic cells from mouse iPS cells which showed antigen-presenting cell function. To fabricate tongue structure in vitro, we applied cyclic strain to mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. We found that application of cyclic strain greatly enhances the skeletal myogenesis of these stem cells with an aligned structure. These findings would be important step toward the further application of these methods to apply development of safety evaluation tools for oral care reagents.

1. 緒 言

近年、国民の歯や口腔内への関心の高まりに伴い、雑誌やインターネット上では口臭予防や歯を白くする効能を謳った歯磨材やデンタルリンス（洗口液）などの商品が数多く販売されている。これら商品の多くは、植物エキスなどを配合して他の商品と差別化を図っているが、薬事法のもと医薬部外品の承認を得るには時間とコストがかかるため、“口腔化粧品”として販売されている実態がある。このような状況下、口腔内に用いる化粧品や医薬品材料の安全性を、動物や健常者由来の細胞を用いるだけでなく、アレルギーなどの疾患を有している患者の細胞を用いて確実に評価する技術の開発は重要な課題である。

口腔粘膜は免疫応答が活発に起こる軟組織である。そのため、本来ならば口腔化粧品の安全性評価は、個人に由来する口腔粘膜細胞を用いることが望ましい。口腔粘膜は、粘膜の最表層を覆う上皮層および線維芽細胞や樹状細胞、T細胞などを含む粘膜固有層から構成されており、これらの細胞が外来刺激に対する免疫応答を担当している。したがって、試験管内で口腔化粧品に対する口腔粘膜の応答を再現するためには、患者由来の上皮細胞、線維芽細胞あるいは樹状細胞などの免疫を制御する細胞を用意する必要がある。特に、患者個人の細胞から抗原提示細胞として機能する樹状細胞を作製する技術は、口腔化粧品などの材料に対する粘膜の免疫応答の個人差に重要な知見を導く可能性

がある。

また、味覚器である舌は口腔内で外来刺激を繊細に感じとる。特に口腔乾燥症（ドライマウス）の患者では、一般的な洗口液であってもこれに含まれるアルコール等の刺激によって舌痛症を引き起こすため、舌に対する口腔化粧品の刺激を試験管内で評価するシステムは有用と思われる。しかしながら、舌を構成している主な細胞は、細胞増殖能力が乏しい骨格筋細胞や味蕾細胞であるため、必要な数の細胞を用意することは困難である。

これに 대응べく、近年では生物の巧妙な機能と構造を基にして工業技術を創り出す生物工学 (Bioengineering) の研究が急速に進展している。また、複雑な構造をもつ粘膜や舌を試験管内で構築するためには、iPS細胞や間葉系幹細胞のように発生学的により未分化な幹細胞を用いることが有用である¹⁾。iPS細胞は、体細胞に数個の遺伝子を導入することでその記憶を初期化した人工多能性幹細胞であり、将来的な組織工学の幹細胞源として大いに期待されている。我々は、歯科治療の過程で切除される機会の多い組織である、口腔粘膜歯肉の細胞を用いることで容易にiPS細胞が樹立可能であることを見出し²⁾、この細胞が歯科医学研究や歯科医療技術に有用なツールになり得るものと期待している³⁾。

一方、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞、神経細胞等様々な組織細胞に分化することが可能である。BMSCは、患者の骨髄液から比較的容易に採取でき、患者への侵襲も少ないため、現実的な組織再生の幹細胞源として期待されている⁴⁾。しかしながら、通常の培養条件では幹細胞を成熟した組織細胞に分化誘導することは容易ではないため、近年では、成長因子や足場の要素に加えて、細胞配向や外的刺激などの生体内における擬似環境を用いて、幹細胞を目的の組織細胞に確実に誘導する技術が注目されている^{5,6)}。



Development of safety evaluation tools for oral care reagents using gingiva-derived iPS cells

Hiroshi Egusa

Division of Molecular and Regenerative Prosthodontics, Tohoku University Graduate School of Dentistry

これらを背景に、本研究課題では、歯肉から採取した線維芽細胞から作製したiPS細胞を、口腔粘膜を構成する細胞（上皮細胞、線維芽細胞、樹状細胞など）に分化誘導できれば、個人由来の培養口腔粘膜として口腔化粧品などの安全性評価に用いることが可能ではないかと考えた。また、BMSCから舌組織の細胞を誘導するために、骨格筋の特異な細胞配向を試験管内で再現する方法に着目した。本研究の目的は、歯肉由来iPS細胞あるいはBMSCを用いて試験管内で口腔粘膜あるいは舌を構成する細胞を作り出し、患者個人の体質を反映した細胞培養システムを構築し、口腔化粧品が口腔粘膜や舌に及ぼし得る為害作用を評価する技術に繋げることである。

2. 実験

2.1 患者歯肉を用いたiPS細胞の樹立

これまでに我々は、山中4因子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）⁷⁾を用いた初期化効率は、マウス歯肉線維芽細胞の方が皮膚線維芽細胞よりも7倍以上高いことを明らかにしている²⁾。ただし、これら初期化因子に含まれるc-Mycは癌遺伝子であるため、これを用いずにiPS細胞を作製することが望ましい⁸⁾。そこで、本研究課題ではヒト歯肉組織を用い、山中4因子からc-Mycを除いた3因子を導入することでiPS細胞の樹立を試みた。

歯科治療の過程で切除された患者歯肉由来の線維芽細胞に、pMXsレトロウイルスベクターを用いてOct3/4, Sox2, Klf4遺伝子を導入し、mitomycin Cで処理したSNLフィーダー細胞上に播種した。形成された胚性幹細胞（ES細胞）様コロニーをクローニングし、そのES細胞様の性質を、RT-PCR解析およびテラトーマ形成実験にて評価した。また、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて同様の初期化誘導を行い、歯肉線維芽細胞の初期化効率と比較検討した。初期化効率の評価では、初期化誘導50～60日目に未分化iPS細胞のマーカーのひとつであるアルカリフォスファターゼ（ALP）について染色を行い、ALP陽性のES細胞様コロニーの数から初期化効率を算出した。

2.2 歯肉由来iPS細胞から樹状細胞への分化誘導

マウスES細胞から樹状細胞に分化誘導した報告^{9, 10)}を参考に、iPS細胞から樹状細胞への分化誘導を試みた。実験には、我々がこれまでに、マウス歯肉線維芽細胞から癌遺伝子c-Mycを用いずに樹立したiPS細胞²⁾を用いた。誘導実験では、iPS細胞をOP9細胞フィーダーと共培養し、CM-CSFを加えた。また、より成熟した樹状細胞様細胞を得るために、TNF- α 、IL-4およびanti CD40を加えた。

歯肉由来iPS細胞から得られた樹状細胞様細胞が抗原提示能を示すか否かを検討する目的で、iPS細胞由来樹状細胞様細胞に卵白アルブミン（OVA）を添加して一晩培養し

た後、培地を交換しOVAを除去した。その後、樹状細胞様細胞をOVA特異的なOT-IIマウス由来のCD4⁺T細胞（FACSAriaTMにて分離）と共に3日間培養し、細胞増殖を評価した。

さらに、作製したiPS細胞由来樹状細胞様細胞による抗原特異的な抗体産生の誘導を評価するため、iPS細胞由来樹状細胞様細胞を雄性C57BL/6マウスの腹腔内に1週間毎に3回注射した。さらに1週間後にOVAを経鼻投与し、その2週間後に血清および唾液中の抗体価を測定した。

2.3 BMSCを用いた骨格筋細胞への分化誘導技術の開発

C57BL/6マウスの大腿骨内腔より取り出した骨髄細胞からBMSCを分離培養し、単一細胞株を樹立する目的で長期継代培養による自然不死化を誘導した。この不死化細胞からシリンドー法および限界希釈法を用いた細胞クローニングによって単一細胞株を作製した。これらの細胞株の中で、著明な骨、軟骨および脂肪細胞への分化能が確認された多分化能細胞株を実験に使用した。BMSCの骨格筋分化誘導には、Mugurumaら¹¹⁾の報告にある培地を用いた。

細胞に反復伸展刺激を与えるための細胞伸展装置を、カスタムメイドで作製した。この細胞伸展装置では、細胞培地中に設置されたシリコンシートの両端がクランプで挟まれている。片方のクランプは固定され、もう一方のクランプが付属のモーターによって一軸方向に牽引を繰り返すことにより、シリコンシート上に播種した細胞に対して周期的伸展刺激が加えられる構造になっている。シリコンシート上にBMSCを播種し、骨格筋分化誘導培地中にて10%、0.17 Hz（10回/1分）の周期的伸展刺激を与え、骨格筋分化を骨格筋細胞分化に特異的な遺伝子発現（RT-PCR法）および蛋白質発現（免疫染色法）について検討した。

3. 結果

3.1 c-Myc癌遺伝子の導入を伴わないヒト歯肉由来iPS細胞の樹立

患者歯肉から樹立したヒト歯肉線維芽細胞を、Oct3/4, Sox2, Klf4の3因子の導入によって初期化を誘導した結果、誘導50日後にES細胞様のコロニーが出現した（図1-A）。これらのコロニーから樹立した3つのiPS細胞クローン株は、いずれもES細胞のマーカー遺伝子である、NANOG, OCT3/4, REX1, SOX2, TERTをES細胞と同程度に発現していた（図1-B）。テラトーマ形成実験の結果、樹立したiPS細胞株はマウス精巣に移植した10週間後に著明な腫瘍形成を示し、腫瘍内部には神経組織（外胚葉由来）、軟骨、筋肉、脂肪組織（中胚葉由来）および腸管上皮様組織（内胚葉由来）の存在を認めた。以上の結果から、樹立したiPS細胞は三胚葉に由来する様々な細胞組織に分化することが可能な多能性幹細胞であることが示された（図1-C）。

また、3名の患者から採取したヒト歯肉線維芽細胞およびヒト皮膚線維芽細胞を用いて初期化効率の検討を行った結果、ヒト歯肉線維芽細胞はOct3/4, Sox2, Klf4の3因子を導入した60日後に約0.02–0.07%の初期化効率を示したのに対して、ヒト皮膚線維芽細胞はES細胞様のコロニーを形成しなかった(図1-A)。

3.2 iPS細胞から樹状細胞への分化誘導

iPS細胞をOP9細胞フィーダーと共培養し、CM-CSFを加えた結果、位相差顕微鏡下にて多くの樹状細胞特有の形態を示す細胞を認めた。また、FACS解析の結果、これらのiPS細胞由来樹状細胞様細胞には、樹状細胞に特異的な細胞表面マーカー(CD11c陽性)の発現を認めた(図2-A)。

iPS細胞由来樹状細胞様細胞にOVAを添加した共培養

群は、OVA非添加群(コントロール群)と比較して、OVA特異的T細胞受容体遺伝子導入マウスとして知られているOT-IIマウス由来のCD4⁺T細胞の数を増加させた(図2-B)。さらに、OVAを添加したiPS細胞由来樹状細胞様細胞をマウス腹腔内に投与することで、血清および唾液中における抗原特異的な抗体産生が著明に亢進した。

3.3 反復伸展刺激がBMSCの骨格筋細胞分化に及ぼす影響

3.3.1 細胞配向

カスタムメイドの細胞伸展装置(図3-A)を用いて周期的伸展環境下でマウスBMSCを48時間培養した結果、細胞および細胞骨格であるアクチン線維は伸展方向に対して並行に様に配向した(図3-B)。一方、静的培養細胞では、

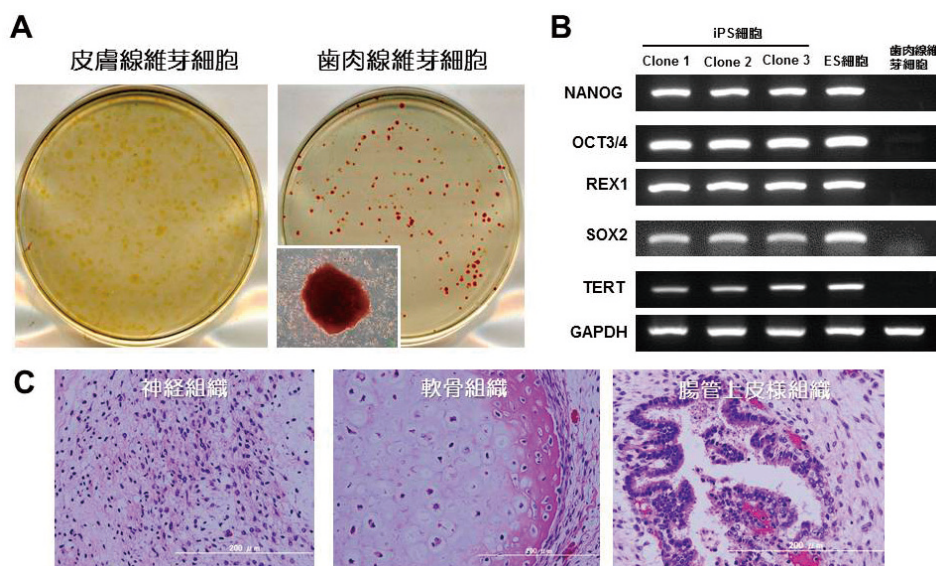


図1 c-Myc導入を伴わないヒト歯肉線維芽細胞由来iPS細胞の樹立
A: 初期化誘導60日後のALP染色像
B: RT-PCR解析(GAPDG: 内源性コントロール)
C: テラトーマ形成実験(HE染色像)

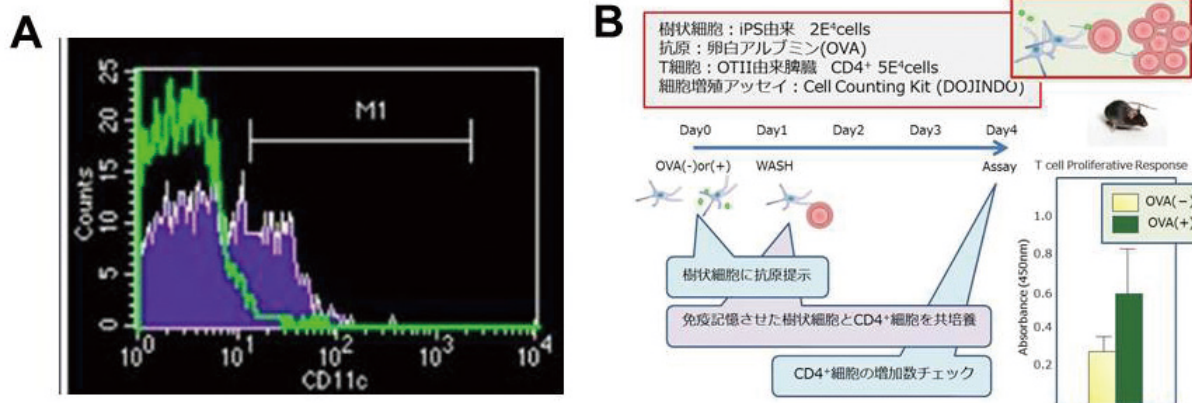


図2 iPS細胞から樹状細胞への分化誘導
A: 樹状細胞マーカー(CD11c)陽性細胞の検出(FACS解析)
B: 抗原(OVA)提示後のiPS細胞由来樹状細胞によるOVA特異的CD4⁺T細胞の増殖

細胞およびアクチン線維の配向は観察されなかった。また、周期的伸展刺激はBMSCを配向させる一方でその増殖を抑制し、骨格筋細胞が成熟する過程の細胞融合に必要な細胞同士の緊密な接触を促した。

3.3.2 骨格筋分化

RT-PCR解析の結果、周期的伸展刺激は骨格筋細胞分化に特異的な遺伝子であるMyf5, myogenin, MRF4の発現を促進した。周期的伸展を与えて培養したBMSCは、平滑筋に特異的な遺伝子であるmyocardinは発現しなかった。また、他の平滑筋マーカー遺伝子である α smooth muscle actin (α -SMA)の発現は、周期的伸展培養によって低下した。一方、周期的伸展刺激はTension-induced / inhibited proteins-1 (TIP1) 遺伝子の発現を促進し、TIP3遺伝子の発現を抑制した。また、周期的伸展刺激は

小胞体ストレスに関連するGlucose-regulated protein 78 (BIP/GRP78)の遺伝子発現を経時的に促進した(図4-A)。リアルタイムRT-PCRの結果、周期的伸展を与えて培養した5および7日後におけるMyf5およびMRF4の遺伝子発現は、静的培養の場合と比較して有意に増加していることが確認された(図4-B)。

また、周期的伸展刺激を5日間与えて培養したBMSCは、細胞が融合した多核の骨格筋細胞様の像を示した(図4-C)。静的および周期的伸展培養5日後の細胞を、骨格筋関連タンパク質myogeninおよびmyosinで免疫蛍光染色した結果、周期的伸展を与えた細胞は、静的に培養した細胞と比較して、これらのタンパク質を強く発現している像が観察された(図4-D)。

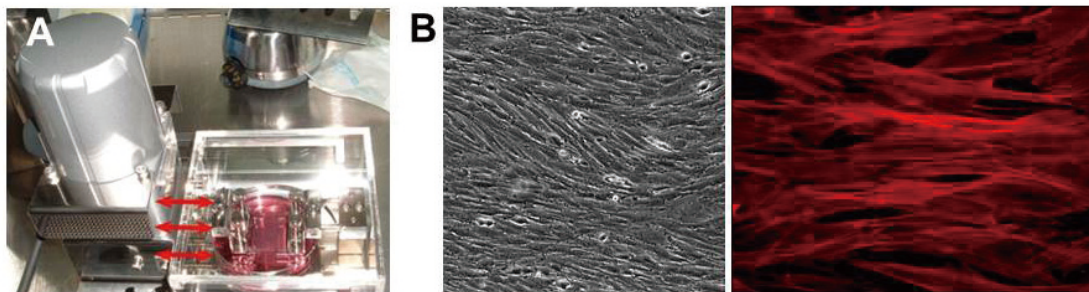


図3 反復伸展刺激が BMSC の細胞配向に及ぼす影響¹²⁾

A: 細胞伸展装置

B: 伸展刺激 48 時間後の BMSC (左図: 位相差顕微鏡像, 右図: ファロイジン染色像)

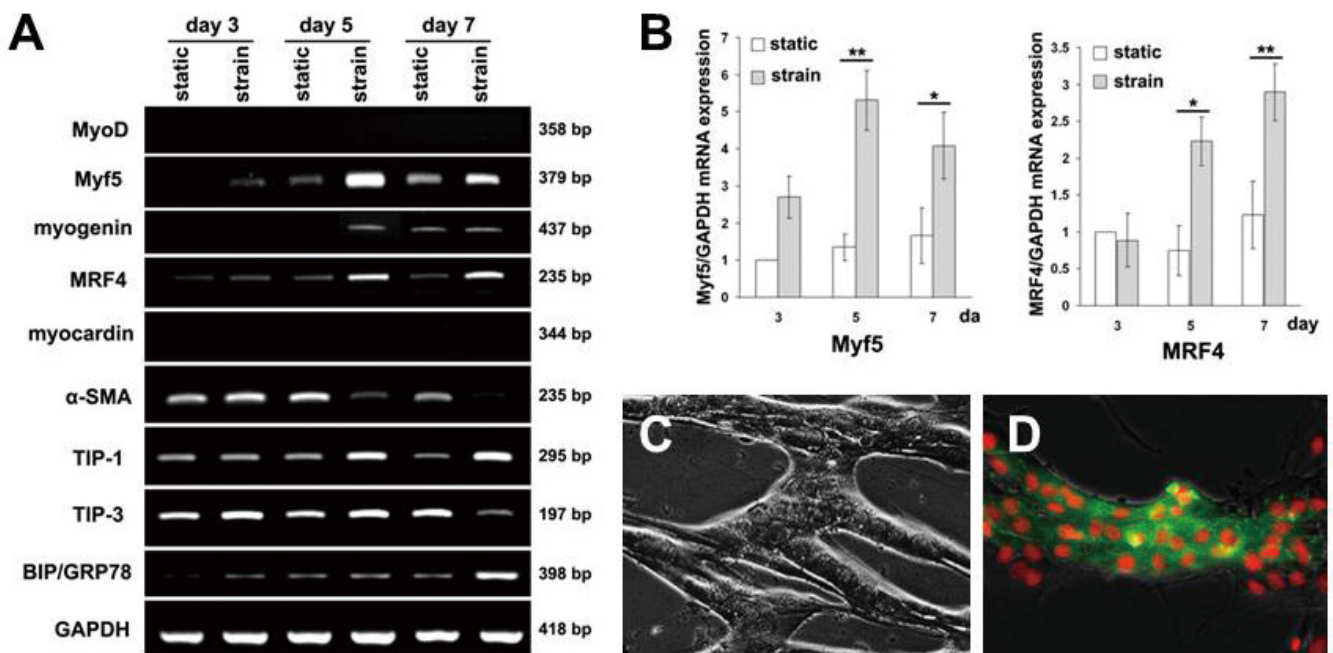


図4 反復伸展刺激が BMSC の骨格筋細胞分化に及ぼす影響¹²⁾

A: RT-PCR 解析 (static: 静的培養。strain: 伸展刺激培養)

B: リアルタイム RT-PCR 解析 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: ANOVA)

C: 伸展刺激 5 日後 (位相差顕微鏡像)

D: 伸展刺激 5 日後 (myosin 免疫蛍光染色像)

4. 考 察

iPS細胞を口腔化粧品品の安全性評価ツールに応用するためには、iPS細胞の資源となる組織の採取が容易で、患者にとって安全・低侵襲でなければならない。また、iPS細胞を効率よく作製するためには、その資源となる組織の細胞は初期化されやすい性質を有していることが望ましい。歯肉は歯科治療の過程で切除される機会の多い組織であり、切除による創傷は良好な治癒経過をたどる。本研究によって、従来iPS細胞作製に用いられている皮膚線維芽細胞ではOct3/4, Sox2, Klf4のみによる初期化誘導は困難であるが、ヒト歯肉線維芽細胞を用いることで癌遺伝子c-Mycを用いなくてもiPS細胞の樹立が可能であることが示唆された。歯肉線維芽細胞は皮膚線維芽細胞と比較してテロメラーゼ活性に関与するTert遺伝子を高発現している²⁾。したがって、歯肉線維芽細胞が初期化されやすい一因として、内在性のTertの発現が関与している可能性が考えられる。臨床現場で日常的に切除して捨てられている歯肉は、優れたiPS細胞の資源であり、将来の医療や薬剤の安全性評価に利用される可能性のある魅力的な組織と言えるであろう。

樹状細胞は、口腔粘膜を含む様々な組織に常在する白血球の一種であり、抗原タンパク質をT細胞に提示する機能をもつ細胞である。樹状細胞は、外来抗原に対する獲得免疫応答を開始させるだけでなく、自己に対する免疫応答を抑制する免疫学的自己寛容の維持、あるいは過剰な免疫応答を抑制する上でも重要な役割を果たしていると考えられている¹⁰⁾。したがって、口腔粘膜に存在する樹状細胞が、口腔化粧品などに対するアレルギー反応に関与している可能性は否定できないため、患者由来の樹状細胞を用いて口腔化粧品に対する応答を評価することには意義があると思われる。しかしながら、成熟した樹状細胞は増殖能をもたないため、患者から十分な数の樹状細胞を得ることは困難である。iPS細胞は自己複製能を有するため、多能性を保ったまま無限に増殖させることが可能である。したがって、無限に増殖できるiPS細胞を材料として樹状細胞を作製することが可能になれば、必要な数の患者由来の樹状細胞を作製できるようになる。本研究において、マウス歯肉由来iPS細胞から抗原提示能を有する樹状細胞を誘導できることが明らかとなった。今後、抗原提示細胞として機能する樹状細胞を患者由来iPS細胞から作製することで、口腔化粧品などに対する患者特有の免疫応答の評価に重要な知見が導かれることが期待される。

多分化能を有するBMSCを、舌を構成する骨格筋細胞に効率的に分化誘導する技術はいまだ確立されていない。生体内の骨格筋組織は伸展、弛緩を繰返しており、組織内の細胞はそれによる力を受けている。本研究では、試験管内における周期的伸展刺激が骨格筋細胞への分化誘導に応

用できる可能性に着目し、周期的伸展刺激がBMSCに及ぼす影響を検討した。その結果、10%, 0.17Hzの周期的伸展刺激は、マウスBMSCを伸展方向に配向し、骨格筋特異的遺伝子およびタンパク質の発現を促すことにより骨格筋分化を促進することが明らかとなった。また、周期的伸展刺激によるBMSCの骨格筋分化促進作用には、細胞配向による細胞間の緊密な接触および機械的刺激に誘発されたTIP1/3あるいは小胞体ストレス関連遺伝子などが関与している可能性が示唆された¹²⁾。本研究で明らかとなった周期的伸展刺激の骨格筋分化誘導作用は、これまで困難であったBMSCの効率的な骨格筋分化誘導を可能とする新たな技術として、組織工学に貢献することが期待される。

5. 総 括

この度のコスメトロジー研究の成果として、ヒト歯肉線維芽細胞を用いることで、癌遺伝子c-Mycを用いずにiPS細胞を容易に樹立することが可能であることを明らかにした。今後、この技術を基盤にして患者由来iPS細胞を用いた口腔粘膜および舌の構築を目指す予定である。また、マウス歯肉由来iPS細胞から抗原提示能を有する樹状細胞を誘導することに成功した。今後は、ヒトiPS細胞を用いて同様の樹状細胞を作製し、口腔化粧品品の生体安全性評価に応用したいと考えている。さらに、周期的伸展刺激を用いて生体内の環境を模倣することにより、BMSCから効率的に骨格筋細胞を作製することが可能であることを明らかにした¹²⁾。今後は、この技術を用いて、三次元的な骨格筋配向細胞の積層化を試みると共に、患者由来iPS細胞を用いても同様の誘導が可能か否かを検討したい。本研究成果が、将来的には患者個人から作製した培養口腔粘膜、樹状細胞あるいは舌組織を用いて、口腔化粧品などに対する患者個人の寛容性を評価するシステムの構築に繋がり、コスメトロジー研究の発展の一助となることを期待する。

謝 辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助いただきましたことを深く感謝申し上げます。また、共同研究者として多大なる御協力を頂いた大阪大学大学院歯学研究科・予防歯科学教室の関根伸一先生に深甚の謝意を表します。

(引用文献)

- 1) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K.; Stem cells in dentistry- Part I: Stem cell sources, J. Prosthodont. Res., 56, 151-165, 2012.
- 2) Egusa H, Okita K, Kayashima H, Yu G, Fukuyasu S, Saeki M, Matsumoto T, Yamanaka S, Yatani H.; Gingival fibroblasts as a promising source of induced

- pluripotent stem cells, PLoS One, 5, e12743, 2010.
- 3) Egusa H.; iPS cells in dentistry, Clin. Calcium, 22, 67-73, 2012.
- 4) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K.; Stem cells in dentistry- Part II: Clinical application, J. Prosthodont. Res., 56, 229-248, 2012.
- 5) Martin I, Wendt D, Heberer M.; The role of bioreactors in tissue engineering, Trends Biotechnol., 22, 80-86, 2004.
- 6) Matsumoto T, Sasaki J, Alsberg E, Egusa H, Yatani H, Sohmura T.; Three-dimensional cell and tissue patterning in a strained fibrin gel system, PLoS One, 2, e1211, 2007.
- 7) Takahashi K, Yamanaka S.; Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell, 126, 663-676, 2006.
- 8) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S.; Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, Nat. Biotechnol., 26, 101-106, 2008.
- 9) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Nishimura Y.; Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells, Stem Cells, 27, 1021-1031, 2009.
- 10) Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, Masuda M, Uemura Y, Araki K, Yamamura K, Nishimura Y.; Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells, Blood, 101, 3501-3508, 2003.
- 11) Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, Sato T, Matsuzawa H, Miyatake H, Akatsuka A, Itoh J, Yahata T, Ando K, Kato S, Hotta T.; In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells, Exp. Hematol., 31, 1323-1330, 2003.
- 12) Egusa H, Kobayashi M, Matsumoto T, Sasaki J, Uruguchi S, Yatani H.; Application of cyclic strain for accelerated skeletal myogenic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with cell alignment, Tissue Eng. Part A, 19, 770-782, 2013.