

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：歯・外分泌腺などの頭部外胚葉器官の上皮・間葉相互作用制御による立体形成技術の開発
2. 研究開発代表者：辻 孝（理化学研究所多細胞システム形成研究センター）
3. 研究開発の成果

目的：ヒト iPS 細胞から、頭部器官（歯、外分泌腺）について器官誘導領域の上皮性ならびに間葉性幹細胞を誘導する分化誘導系を確立することを目的とし、頭部器官に特異的な器官誘導の「器官形成場」としての領域を一体形成するための段階的、かつ複合的な分化誘導系を開発する。また、ヒト iPS 細胞から誘導した組織から上皮性幹細胞や間葉性幹細胞を分離、あるいは、iPS 細胞に成長因子や細胞外基質の添加などの培養環境を変化させることにより、上皮性ならびに間葉性幹細胞を個別に誘導し、これらの細胞を用いて器官原基を再生することにより器官誘導技術の開発を実施する。これらを他の個別課題の iPS 細胞技術と経験を有する拠点と連携し、最新のヒト iPS 細胞操作技術を導入し、器官再生医療の実現に向け、幹細胞操作技術開発の基盤技術、ならびに三次元化器官を育成しうる培養システムの技術開発を推進する。

### 1) iPS 細胞からの頭部器官誘導の「器官形成場」の一体形成技術の開発

平成 26 年度までのマウス iPS 細胞を用いた検討において、頭胸部領域の外分泌腺を誘導したサイトカイン等の条件を参考に、今年度からヒト iPS 細胞を用いた上皮・間葉一体誘導の検討を開始した。ヒト iPS 細胞由来胚様体 (EB) を培養し、培養 6 日後に、EB 内部に神経堤細胞マーカー陽性細胞を誘導する技術を開発した。この EB を生体内培養により誘導評価したところ、移植物内に毛包や外分泌腺様構造を有する器官の形成が認められ、ヒト iPS 細胞由来 EB においても頭部外胚葉性器官を誘導可能であることが示唆された。そこで生体外培養による器官再生を目指し、頭部外分泌腺の発生に重要なサイトカインを添加し、培養を行った。その結果、培養 21~31 日目には、EB は外側に外胚葉性上皮細胞、境界面に基底膜、内側に神経堤細胞を有する下顎領域の原基となる第一鰓弓領域を再現していることが示唆された。

### 2) 頭部器官に特異的な上皮性幹細胞と間葉性幹細胞の誘導技術の開発

今年度から、ヒト iPS 細胞を用いて頭部器官誘導領域の上皮性ならびに間葉性幹細胞の分化誘導系を確立することを目的とし、誘導条件の検討を行った。上皮性幹細胞の誘導条件については、単一化ヒト iPS 細胞の平面培養により検討を行い、培養 10 日後に外胚葉性上皮細胞、及び予定口腔上皮細胞へと誘導される条件を得た。予定口腔上皮細胞の被器官誘導能を、マウス胎子の歯胚間葉組織との再構成、及び生体内培養により評価した結果、マウス間葉細胞由来の象牙質は見られたものの、ヒト上皮細胞由来のエナメル質形成は認められなかった。間葉性幹細胞の誘導条件については、1) で誘導した神経堤細胞を含む EB を平面培養により検討した。その結果、サイトカイン刺激により培養 9 日目に神経堤細胞マーカー遺伝子の発現減少と、口腔間葉細胞マーカー遺伝子の発現上昇が生じ、予定口腔間葉細胞へ分化したことが示唆された。

### 3) 上皮性幹細胞と間葉性幹細胞の三次元的な組織からの頭部器官誘導技術の開発

今年度は、ヒト iPS 細胞由来 EB や誘導された幹細胞の EB への器官誘導シグナル導入による器官誘導法の実現に向け、ヒト器官原基誘導遺伝子を発現するアデノウイルスベクターの構築を行い、須賀らより技術導入した EB の長期培養により形成した上皮組織・間葉組織への局所的なシグナル導入による器官誘導シグナル候補分子の特定を進めるとともに、本研究グループが独自に見出した器官誘導遺伝子 Epidermacan の分子メカニズムの解析を行った。器官誘導シグナルを導入した iPS 由来 EB 内に誘導された外分泌腺様構造の器官を効率的かつ正確に同定するために組織化学解析による評価系の構築を行い、唾液腺、汗腺などの外分泌腺の種類を区別し器官誘導シグナルの器官誘導能を評価することが可能となった。