

主論文の要旨

**BMP4 and FGF strongly induce differentiation of
mouse ES cells into oral ectoderm**

〔 BMP4とFGFはマウス胚性幹細胞における口腔外胚葉への
分化誘導の安定化に寄与する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

落合 啓史

【緒言】

胎児発生において口腔外胚葉からは、下垂体前葉原基、歯のエナメル質原基、口腔上皮、鼻腔上皮が分化するが、これをマウス胎生幹(ES)細胞を用いて再現し、口腔外胚葉に分化誘導するのに成功した報告は少ない。既報 (Suga, et al. 2011) では下垂体前葉への分化誘導の過程で口腔外胚葉への誘導を経るものが報告されているが、口腔外胚葉に焦点をあてた詳細な報告は限られている。また、マウス ES 細胞の継代においては、動物成分を含む胎児ウシ血清(FBS)やノックアウト血清代替物(KSR)を用いるが、そのロット差が分化誘導効率に影響を与えるという問題がある。我々は FBS や KSR のロット差の影響を受けない、安定した口腔外胚葉分化誘導法を確立すべく検討を行った。

【方法】

既報の分化誘導法をベースとして、下垂体前葉原基の発生に重要とされる Bone Morphogenetic Protein (BMP4)、Fibroblast Growth Factors (FGF)、Sonic hedgehog (Shh) などを最適化することでマウス ES 細胞から口腔外胚葉を分化誘導した。分化誘導効率は、口腔外胚葉のマーカーである Pitx1 の発現を免疫染色法で確認することで評価した。続いて、誘導した口腔外胚葉を下垂体前葉原基や歯胚原基へ分化させることで口腔外胚葉としての性質を裏付けた。最後に、新規分化誘導法における FBS と KSR のロット差の影響について確認した。

【結果】

1 継代用メディアウムに含まれる FBS と KSR のロット差は、マウス ES 細胞における口腔外胚葉への分化誘導効率に影響を与える。

以前に我々は、マウス ES 細胞における口腔外胚葉への分化誘導法として、インスリンなどの成長因子を含まない分化メディアウム(growth factor free/Chemically Defined Medium : gf/CDM)を用いた凝集体浮遊培養法(Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates with quick reaggregation: SFEBq 法)にソニックヘッジホッグアゴニスト(SAG)で処理する方法を報告した(以下「既報の分化誘導法」と記す)。既報の分化誘導法における血清成分のロット差の影響を確認するために、3種類の FBS と3種類の KSR を含む5種類の継代用メディアウムを準備(Fig.1A)し、マウス ES 細胞を14日間継代した後に既報の分化誘導法で培養した(Fig.1B)。その結果、免疫染色法では Pitx1 陽性の口腔外胚葉を持つ凝集体は9-36%と既報に比して低い割合で確認された(Fig.1C、D)。このことから、既報の分化誘導方法においては、動物成分のロット差が分化誘導効率に影響を与えることが示唆された。

2 BMP4 はマウス ES 細胞を Pitx1 陽性の口腔外胚葉へ分化誘導する。

マウスの胎児発生においては、腹側視床下部は BMP4、FGF8/10/18 を発現し、一方で、下垂体前葉原基を除く口腔外胚葉では Shh の発現が確認される。背側からの

BMP4/FGF と腹側からの Shh の濃度勾配が、下垂体前葉原基を誘導する転写因子の発現に重要であるとされる。そのため、これらを含む様々な成長因子(BMP4、FGF8、Shh)の最適化の検討(Fig. 2A、B)や、分化誘導時の細胞数や分化メディウムの栄養成分の最適化を試みた。その結果、BMP4 は口腔外胚葉への分化誘導を促進することが確認された。特に低濃度の BMP4 は Rax 陽性の神経層を保ちながら口腔外胚葉を誘導した(Fig. 2C-F)。

3 FGF8 と FGF10 は Pitx1 陽性の口腔外胚葉を下垂体前葉原基に分化誘導する。

マウスの胎児発生においては、Lim3 陽性の下垂体前葉原基からホルモン産生細胞が分化する(Fig. 3A)。そして、Lim3 陽性の下垂体前葉原基の発生には FGF と FGF10 が重要とされる。我々の検討においては、既報の分化誘導方法に SAG と BMP4 を加えた分化誘導方法では Lim3 陽性細胞は確認されなかったが、FGF8 と FGF10 の処理は(Fig. 3B)、マウスの発生と同様に、Lim3 陽性のパウチ構造を視床下部神経層と口腔外胚葉の間に分化誘導した(Fig. 3C、D、H)。さらに、ACTH(Fig. 3E、F)や Tbx19(Fig. 3I) 陽性のコルチコトロフや、ソマトトロフ、ラクトロフ、サイロトロフの3系統に分化しうる Pit1 陽性細胞(Fig. 3G、J)を分化誘導した。このことから、分化誘導した Pitx1 陽性細胞は下垂体前葉原基に分化しうる口腔外胚葉の性質を持つことが裏付けられた。

4 BMP4 はマウス ES 細胞を歯胚上皮と歯胚間葉系細胞に分化誘導する。

マウスの胎児発生において、口腔外胚葉からは歯胚上皮も発生する。歯胚原基は口腔外胚葉と歯胚間葉系細胞の相互作用から生じる。歯胚間葉系細胞は外胚葉由来の神経堤細胞から発生するが、BMP4 は原腸陥入期において外胚葉を神経堤細胞に分化誘導する。我々は、より濃度が高い BMP4 で処理することにより(Fig. 3K)、Brachury(神経堤細胞のマーカー)陽性細胞を分化誘導した(Fig. 3L)。さらに、Dlx2 陽性/Pitx1 陽性の歯胚上皮様の細胞をマウスの発生と同様に、口腔外胚葉と Pax9 陽性/Dlx2 陽性の歯胚間葉細胞の間に分化誘導した(Fig. 3M)。

5 BMP4 と FGF8/10 はマウス ES 細胞における口腔外胚葉への分化誘導法の安定化に寄与する。

既報の誘導方法に BMP4 と FGF8/10 を加えた新規誘導方法における血清成分のロット差の影響を確認した。Fig.1 と同様に、口腔外胚葉の分化誘導効率を免疫染色法で評価した(Fig. 4A)。口腔外胚葉をもつ凝集体は 78-90%と高率に確認された(Fig. 4B,D-H)。このことから、新規誘導方法は既報の誘導方法法に比較して、血清成分のロット差の影響を受けないことが示された。

【考察】

今回、我々は口腔外胚葉や下垂体前葉原基の発生に重要な成長因子で処理することで、マウス ES 細胞を口腔外胚葉や下垂体前葉原基へ分化誘導することに成功して

いる。また、分化誘導した Pitx1 陽性細胞が下垂体前葉原基に分化したことは、Pitx1 陽性細胞が口腔外葉用の性質を持つことの裏付けとなっている。

さらに、我々は世界で初めて成長因子を用いてマウス ES 細胞から歯胚上皮を分化誘導した。興味深いことに、この方法は歯胚上皮だけでなく歯胚間葉細胞も誘導した。これらの細胞の相互作用は歯の発生に重要とされる。この新しい誘導方法は歯の再生医療の発展に寄与する可能性がある。

既報の分化誘導方法における口腔外胚葉の分化誘導効率、我々が以前に報告した結果と大きく異なるものであった。継代用メディウムに含まれる動物由来成分(FBS や KSR)は動物個体で成長因子やサイトカインなどの構成成分に差異があるとされる。動物由来成分のロットが異なる場合、分化誘導法の再現性の確認や、誘導法の最適化の検討が必要となるかもしれない。

【結語】

既報の分化誘導方法に BMP4 と FGF を加えることで、血清成分のロット差の影響を受けない安定した口腔外胚葉への誘導方法を確立した。