

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05037

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から誘導した神経堤細胞による歯の再生と歯形成細胞への分化機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of tooth regeneration strategy by neural crest cells induced from human iPS cells

研究代表者

本田 雅規 (Honda, Masaki)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：70361623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯の発生は、外胚葉性の上皮細胞と外胚葉性の神経堤細胞の相互作用によって始まる。そこで、われわれは、歯の組織形成を可能とする神経堤細胞をiPS細胞を作り出すことと、その神経堤細胞から歯の組織を再生させることを目的に本課題に取り組んだ。そして、この3年間の研究機関において、ヒト歯髄細胞からiPS細胞を樹立後に、神経堤細胞に分化誘導させて移植すると象牙質、セメント質が再生できることを確認できた。

研究成果の概要(英文)：Tooth development is started from the interaction between epithelial and neural crest derived mesenchymal cells. We try to induce human iPS cells into neural crest cells to develop dental tissues. First, we are successfully induced the human iPS cells into neural crest cells. Then, the dentin and cementum formation are successfully generated from transplanted the combination both neural crest cells and dental epithelial cells in tissue engineering methods. These results indicated that the object in this study are almost achieved during three years.

研究分野：組織学・発生学

キーワード：tooth regeneration neural crest cells iPS cells tissue engineering dentin cementum

1. 研究開始当初の背景

歯の外形全体を再生させる研究では、マウス帽状期の歯胚の細胞からはほぼ完全な歯を再生できることが報告されている(東京理科大 Nature Methods 2009)。しかし、実際の臨床を考えると、胎児期の歯胚を用いることは困難と考えるので、生後の歯胚を使うことが必須と考える。しかし、これまでの生後の歯胚細胞から歯全体を再生させることは大変難しいことが分かってきた。2008年に発見された iPS 細胞は、成体の細胞から歯を再生させることを可能とする細胞源となる。そこで、臨床応用可能となるヒトの細胞から樹立した iPS 細胞を用いた歯の再生方法を確立することを目的に研究計画を立案したが、iPS 細胞と歯の形成細胞と混合させて移植すると iPS 細胞からエナメル芽細胞、象牙芽細胞への分化は確認できたが、テラトーマが 100% 形成される。そこで、iPS 細胞を神経堤細胞に分化させてテラトーマを形成せずに、歯の組織を再生する手法を確立することを本研究の目的とした。

2. 研究の目的

当初の本研究課題の大きな目的は次の3つであった。

- 1) iPS 細胞から誘導した神経堤細胞が象牙芽細胞およびセメント芽細胞に分化できることを明らかにする。
- 2) その神経堤細胞と上皮組織および上皮細胞とを組み合わせると歯全体を再生させる。
- 3) 移植してできた再生歯の形態が正常な形態となる組み合わせ方法を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

1) 乳歯及び永久歯の歯髄細胞に核初期化物質 Oct3/4、Klf4 および Sox2 にて、iPS 細胞を樹立する。iPS 細胞の確認については移植

実験にて3胚葉に分化することを確認する。

2) iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導は、EB を作製後、神経堤細胞分化誘導培地を用いて誘導する。培養後 4~5 日後に細胞凝集塊をフィブロネクチンコート培養皿に移し、培養を続けると細胞凝集塊は培養皿底面に接着し、細胞凝集塊から増殖・遊走した細胞を p75NTR、Nestin、AP2 の分化マーカーにて確認する。

3) 生後6か月のブタ下顎にある埋伏している鐘状期の第3大臼歯を抜歯後、ディスペーゼにて上皮と歯乳頭を分離し、上皮組織と神経堤細胞を組み併せてヌードラットの腹部大網に移植する。ブタ歯胚細胞のみを移植した時には、象牙質の形成が8~12週で、エナメル質形成が12~14週で観察している。そこで、移植期間は4、6、8、12、14週として、再生組織を評価する。

その評価方法として、移植した細胞の局在をヒトミトコンドリア抗体にて同定する。さらに、細胞特異的な抗体にて移植した iPS 細胞が象牙芽細胞、エナメル芽細胞およびセメント芽細胞に分化することを明らかにする。

4. 研究成果

本研究が始まるまでに、ヒト歯髄細胞から iPS 細胞は樹立できた。また、この iPS 細胞と歯の細胞を混合して移植するとエナメル質、象牙質、およびセメント質が形成されることが分かった(J Hard Tissue Biology in press)。しかしながら、テラトーマが観察されたことから、歯髄細胞から樹立した iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導を試みることとなった。分化誘導方法は、ヒト ES 細胞から誘導する方法を用いて行ったところ、神経堤細胞のマーカーの遺伝子発現およびタンパクの発現を確認したので、神経堤細胞に分化していることが示唆された。しかしながら、一部のマーカーで異なるパターンを示したので、分化誘導して得られた神経堤細胞を

さらにシュワン細胞への分化誘導を試みたところ、シュワン細胞のマーカーの発現が確認できた。さらに、神経堤細胞の多分可能を確認するために組織工学的手法を用いて移植したところ、骨芽細胞および軟骨細胞に分化することを確認した。以上の in vitro と in vivo の実験結果から iPS 細胞から神経堤細胞に分化できたと結論付けた。次に、この分化誘導した神経堤細胞から歯の形成細胞への分化能を確認することを計画した。

最終年度は、研究分担者が日本大学歯学部から愛知学院大学歯学部に移動になったことから、今年、新たに理研から線維芽細胞から作製したヒト iPS 細胞 (253G1) を購入し、神経堤細胞への誘導を行うことから実験を開始した。線維芽細胞から作製した iPS 細胞においても神経堤細胞への誘導は可能であった。さらに、iPS 細胞から誘導した神経堤細胞の特性としてシュワン細胞に分化することも確認した。

次に、この神経堤細胞が歯の形成細胞に分化できることを確認するために、ブタ歯胚上皮組織と混合してヌードラットの大網に移植した。移植 20 週後に、移植体を観察すると、全ての移植体において奇形種は認められなかった。次に、マイクロ CT による観察を行うと硬組織が確認できた。そこで、組織学的に解析を行うと、エナメル質、象牙質、セメント質および骨が観察できた。そこで、各組織の評価のために、特異的抗体を用いて免疫科学的に、アメロゲン、デンチンシアロプロテイン、ポーンシアロプロテイン抗体にてエナメル質、象牙質およびセメント質であることを確認した。次に、担体に形成された組織および細胞が移植した神経堤細胞由来であることを確認するためにヒト核抗体およびヒトミトコンドリア抗体を用いて確認したところ、エナメル芽細胞、象牙芽細胞およびセメント芽細胞において陽性反応が認められた。神経堤細胞はヒト iPS 細胞から分化誘

導した細胞であり、移植した動物はラット、また、神経堤細胞と混合したブタ由来の上皮細胞であることから、ヒト核抗体への交差性が無いことを確認し、移植した細胞から誘導した細胞であることを確認した。以上の結果から、それぞれの組織は移植した神経堤細胞から分化誘導したエナメル芽細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞から形成されたことが明らかになった。これらの結果については現在、投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Okuwa Y, Toriumi T, Nakayama H, Ito T, Otake K, Kurita K, Nakashima M, Honda M: Transplanting effect of dental pulp-derived cells on peripheral nerve regeneration in crushed sciatic nerve injury, Journal of Oral Science, 査読有、2018, in press

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Honda M: Effect of collagenase concentration for isolating small adipocytes from human buccal fat pad, Journal of Oral Science, 査読有、Vol.60, No.1, 2018, 14-23 DOI: org/10.2334/josnusd.16-0786

Honda M, Sato M, Toriumi T: Characterization of Coronal Pulp Cells and Radicular Pulp Cells in Human Teeth, Journal of Endodontics, 査読有、Vol.43, No.9S, 2017, S35-S39 DOI: 10.1016/j.joen.2017.06.005

Moriguchi K, Hasegawa Y, Higuchi N, Murakami Y, Yoshimura F, Nakata K, Honda M: Energy dispersive spectroscopy-scanning transmission electron microscope observations of free radical production in human polymorphonuclear leukocytes phagocytosing non-opsonized Tannerella forsythia, Microscopy Research Technique, 査読有、Vol.80, No.6, 2017, 555-562 DOI: 10.1002/jemt.22819

Iguchi S, Suzuki D, Kawano E, Mashimo T, Kajiya M, Toriumi T, Kawai T, Kurihara H, Isokawa K, Sato S, Honda M: Effect of local bone marrow stromal cell administration on ligature-induced periodontitis in mice,

査読有、Journal of Oral Sciences、Vol.59、No.4、2017、629-637 DOI: org/10.2334/josnusd.16-0033

Suzuki D, Akita D, Tsurumachi N, Kano K, Yamanaka K, Kaneko T, Kawano E, Iguchi S, Toriumi T, Arai Y, Matsumoto T, Sato S, Honda M: Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells into three-wall defects in the rat periodontium induces tissue regeneration, Journal of Oral Science、査読有、Vol.59、No.4、2017、611-620 DOI: org/10.2334/josnusd.16-0878

Kawano E, Toriumi T, Iguchi S, Suzuki D, Sato S, Honda M: Induction of neural crest cells from human dental pulp-derived induced pluripotent stem cells, Biomedical Research、査読有、Vol.38、No.2、2017、135-147 DOI: 10.2220/biomedres.38.135

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonoji M, Isokawa K, Shimizu N, Honda M: Small Buccal Fat Pad Cells Have High Osteogenic Differentiation potential, Tissue Eng Part C Methods、査読有、Vol.22、No.3、2016、250-259 DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0420

Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, Mashimo T, Sato-Shionome M, surumachi N, Yamanaka K, Kaneko T, Toriumi T, Arai Y, Tsukimura N, Matsumoto T, Ishigami T, Isokawa K, Honda M: Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration, Front Physiol、査読有、Vol.50、No.7、2016、1-12 DOI: 10.3389/fphys.2016.00050

Shino H, Hasuike A, Arai Y, Honda M, Isokawa K, Sato S: Melatonin enhances vertical bone augmentation in rat calvaria secluded spaces, Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal、査読有、Vol.21、No.1、2016、e122-126 DOI: 10.4317/medoral.20904

Mikami Y, Tsuda H, Akiyama Y, Honda M, Shimizu N, Suzuki N, Komiyama K, Alkaline phosphatase determines polyphosphate-induced mineralization in a cell-type independent manner, J Bone Miner Metab、査読有、Vol.34、No.6、2015、627-637 DOI: 10.1007/s00774-015-0719-6

Ishijima M, Hirota M, Park W, Honda MJ,

Tsukimura N, Isokawa K, Ishigami T, Ogawa T: Osteogenic cell sheets reinforced with photofunctionalized micro-thin titanium, JBiomater、査読有、Vol.29、No.10、2015、1372-84 DOI: 10.1177/0885328214567693

Toriumi T, Takayama N, Murakami M, Sato M, Yuguchi M, Yamazaki Y, Eto K, Otsu M, Nakauchi H, Shirakawa T, Isokawa K, Honda MJ: Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth, Biomed Res、査読有、Vol.36、No.1、2015、31-45 DOI: 10.2220/biomedres.36.31

〔学会発表〕(計29件)

本田雅規: 間葉系幹細胞“歯髄幹細胞”を用いた細胞治療の現状と今後の展望. 第17回日本再生医療学会総会、2018.

大竹啓太、鳥海 拓、大桑雄太、伊藤発明、磯部仁博、佐久太郎、栗田賢一、本田雅規: 型コラーゲン中空性担体を使用したラット坐骨神経の再生. 第17回日本再生医療学会総会、2018.

鳥海 拓、河野英輔、普天間拓、中村浩紀、湯口眞紀、磯川桂太郎、本田雅規: ヒト iPS 細胞から分化した神経堤細胞の象牙芽細胞への分化能および象牙質形成能. 第17回日本再生医療学会総会、2018.

大桑雄太、鳥海 拓、伊藤発明、大竹啓太、中山英典、栗田賢一、本田雅規: ラット坐骨神経挫滅モデルに対する歯髄細胞の有効性. 第17回日本再生医療学会総会、2018.

館野敦、秋田大輔、鶴町仁奈、田村瑛子、鳥海 拓、風間智彦、月村直樹、松本太郎、本田雅規: 脱分化脂肪細胞とリコンビナントペプチドによる顎骨再生能の検討. 第17回日本再生医療学会総会、2018.

伊東雅哲、鳥海 拓、夏目長門、本田雅規: 動物実験モデルとしてのラット口蓋裂の評価. 第17回日本再生医療学会総会、2018.

鳥海 拓、渡辺雅弘、岡 篤志、篠田雅路、岩田幸一、磯川桂太郎、本田雅規: ヒト iPS 細胞を利用した末梢神経再生. Final Symposium Research Network on Cell Transplantation for Functional Recovery of Oral Sensory Disorders、2018.

鳥海 拓、本田雅規: 神経堤細胞による象牙質再生. フロンティアミーティング in 新潟 2018.

Toriumi T, Kawano E, Yuguchi M, Isokawa K, Honda M: Dentin and cementum engineering

from neural crest cells derived from human induced pluripotent stem cells. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017.

鳥海 拓, 渡辺雅弘, 篠田雅路, 普天間拓, 岩田幸一, 磯川桂太郎, 本田雅規: ラット下歯槽神経切除モデルにおける iPS 細胞由来神経堤細胞の移植効果. 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 2017.

本田雅規: 歯髄幹細胞を中心とした幹細胞治療の現状と今後の展望. 第 60 回 NPO 法人口腔科学会中部地方部会, 2017.

大桑雄太, 伊藤発明, 大竹啓太, 中山英典, 栗田賢一, 本田雅規: ラット坐骨神経挫滅モデルにおける歯髄細胞移植の効果. 第 38 回日本炎症・再生医学会, 2017.

鳥海 拓, 渡辺雅弘, 岡 篤志, 篠田雅路, 磯部仁博, 佐久太郎, 岩田幸一, 磯川桂太郎, 本田雅規: iPS 細胞由来神経堤細胞を利用した下歯槽神経の再生 (優秀発表賞受賞). 第 37 回歯科薬物療法学会学術大会, 2017.

本田雅規: 間葉系幹細胞の基礎とその臨床応用 - 歯髄細胞治療の現状と今後の展望 - 第 37 回歯科薬物療法学会学術大会, 2017.

大谷憲司, 土屋花織, 加藤美咲, 本田雅規: 無血清培地にて培養したヒト、髄細胞の特性と細胞接着の解析. 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017.

Suzuki D, Iguchi S, Kawano E, Tsurumachi N, Toriumi T, Isokawa K, Arai Y, Sakai A, Ooshio K, Sugano N, Sato S, Honda M: Dedifferentiated fat cells for tissue engineering in rat periodontal defects. The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and Japanese academy of Clinical Periodontology, 2016.

Iguchi S, Kawano E, Suzuki D, Tsurumachi N, Kajiya M, Toriumi T, Isokawa K, Arai Y, Fukuda T, Fujisaki Y, Sugano N, Sato S, Honda M: Use of BMSCs prevents alveolar bone resorption on experimental periodontitis. The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and Japanese academy of Clinical Periodontology, 2016.

鳥海 拓, 河野英輔, 磯川桂太郎, 本田雅規: ヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経堤細胞の特性. 第 58 回歯科基礎医学学会学術大

会, 2016.

加藤美咲, 大谷憲司, 濱村和紀, 本田雅規: 無血清培地にて培養したヒト歯髄細胞の特性の解析. 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会, 2016.

大谷憲司, 佐久間重光, 本田雅規: 急性期ラット脊髄圧挫損傷モデルに対する歯髄細胞移植による後肢運動回復への効果. 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会, 2016.

②鳥海 拓, 河野英輔, 岡 篤志, 井口慎也, 鈴木大悟, 磯川桂太郎, 本田雅規: ヒト歯髄細胞から樹立した iPS 細胞のエナメル芽細胞, 象牙芽細胞, セメント細胞への分化. 第 25 回硬組織再生生物学会学術大会・総会, 2016.

②高橋知里, 松原庸博, 小川法子, 盛口敬一, 本田雅規, 川嶋嘉明, 山本浩充: バイオフィルム感染症治療を目的とした高分子ナノ粒子 DDS 製剤設計とその評価. 粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム, 2016.

③本田雅規: ヒト iPS 細胞は歯を形成する細胞に分化できる. 粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム, 2016.

④本田雅規: ヒト歯髄細胞の特性とその細胞治療, そして今後の課題. 第 37 回日本歯内療法学会学術大会, 2016.

⑤Honda M: Dental pulp cells as a cell source for tissue regeneration. International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology Regeneration Group (PBGR) Symposium 2016, 2016.

⑥Honda M: Use of human iPS cells for tissue-engineered tooth. 12th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, 2016.

⑦本田雅規, 鳥海 拓: iPS 細胞は, エナメル芽細胞, 象牙芽細胞, セメント芽細胞に分化する. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2016.

⑧Honda M, Toriumi T: Human iPS Cells are Capable of Differentiating into Ameloblasts, Odontoblasts, and Cementoblasts. Gordon Research Conference, Bone and Teeth, 2016.

⑨Honda M, Toriumi T: Tooth-tissue engineering - current status and future directions. 4th Tripartite Conference on Tooth and Bone Development & Regeneration, 2015.

〔図書〕(計4件)

大島勇人、本田雅規、佐藤陽治 他多数、
シーエムシー出版、再生医療・細胞治療のた
めの細胞加工物評価技術、2016、239

新井直也、新崎章、飯野光喜、本田雅規 他
多数、医学書院、言語聴覚士のための基礎知
識 臨床歯科医学・口腔外科学、2016、311

磯川桂太郎、稲井哲一郎、入江一元、本田
雅規 他 13名、わかば出版、カラーアトラ
ス口腔組織発生学、2016、135

Honda MJ、Toriumi T、Oka K、Saito Y、
Isokawa K、Elsevier、Stem cell biology and
engineering in dental sciences、2015、900

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計3件)

名称：歯周組織再生用材料
発明者：本田雅規 秋田大輔 他5名
権利者：学校法人日本大学
株式会社ジーシー

種類：特許
番号：6304715
取得年月日：平成30年3月16日
国内外の別：国内

名称：iPS細胞の高効率な樹立方法
発明者：本田雅規 鳥海 拓
権利者：学校法人日本大学
種類：特許
番号：6128511
取得年月日：平成29年4月21日
国内外の別：国内

名称：脱分化脂肪細胞の製造方法
発明者：本田雅規 鶴町仁奈 他4名
権利者：学校法人日本大学
種類：特許
番号：5991687
取得年月日：平成28年8月26日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.aichi-gakuin.ac.jp/lecture/kokukaibou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 雅規 (HONDA, Masaki)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：70361623

(2) 研究分担者

磯川 桂太郎 (ISOKAWA, Keitaro)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：50168283

湯口 眞紀 (YUGUCHI, Maki)
日本大学・歯学部・助手
研究者番号：00256885

鳥海 拓 (TORIUMI, Taku)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：40610308

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし