

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11336

研究課題名(和文) iPS細胞とリン酸化プルランを用いた新規骨補填材の開発

研究課題名(英文) Development of new bone prosthetic material using iPS cell and phosphorylated pullulan

研究代表者

清流 正弘 (Seiryu, Masahiro)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80510023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究結果として、1)マウスiPS細胞から神経堤様細胞(NCLC)の誘導に成功した。2)マウス頭蓋骨欠損モデルの動物用CT、組織切片による評価においてTCP+NCLC群はTCP+MC3T3群に比較して治癒傾向が強いことが示された。3)ラット抜歯窩の動物用CTによる評価においてTCPおよびリン酸化プルランを埋入した群のCT値が他の群と比較して高い傾向があることが示された。以上より、iPS細胞から誘導したNCLCと徐放化キャリアとしてのリン酸化プルランを用いることにより細胞の足場と増殖分化因子の徐放化を可能とした新規骨組織再生誘導が実現できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The result of this study is as follows, 1) We succeeded in the induction from iPS cells of the mouse to the neural crest like cells. 2) TCP+NCLC group was shown to be stronger in a tendency to healing than TCP+MC3T3 group. 3) The CT value of the group of TCP+phosphorylated pullulan was higher than other groups. The results suggested that new bone prosthetic material may be realized by using iPS cell and phosphorylated pullulan.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯学 再生医学

1. 研究開始当初の背景

わが国における口唇裂口蓋裂の出生数は400-600名に1名であり、顎顔面領域で最も発生頻度の高い先天性疾患である。近年、これらの患者の顎裂骨欠損部の再建治療として、自家腸骨海面骨移植術が行なわれるようになり、年間約1500名以上の患者がこの手術を必要としている。しかし、子どもへの自家骨移植は、移植片採取のための侵襲性の大きい手術が必要で、採取可能な骨量、形状に制限があり、肉体的、精神的負担が大きい等の重篤な問題が存在する。そのため、自家骨に代わる人工骨再生担体の開発に対するニーズが高まっている。近年、歯科領域において、骨の代謝回転を高めることを目的に様々な材料が応用され、研究が進んでいる。しかしながら、自家骨移植に匹敵した骨置換速度を得るためには、更なる生体内吸収性や形態付与能の向上が求められている。

Tissue Engineeringによる組織の再生には、細胞の足場(scaffold)、細胞、増殖分化因子の3つが重要な役割を果たしている。しかし、増殖分化因子タンパクを水溶液の状態で投与すると、急速な拡散が起こり十分な効果が得られず、予知性はきわめて乏しい。また局所への増殖分化因子の過剰投与により、副作用も懸念される。そのため、各種増殖分化因子の放出期間をコントロールする徐放化キャリア(担体)の併用が必須の要件となる。研究協力者の沖原、吉田らは、独自に開発した多糖誘導体リン酸化プルランをコアとして、口腔ケア製品、骨セメント、歯の直接覆髄材、インプラント表面処理材など様々な医療製品の開発に取り組んできた。多糖プルランをリン酸化して合成したリン酸化プルランは、生体組織に対し低刺激でかつ、生体硬組織(骨や歯)無機成分であるアパタイトに対し強固に接着する。さらに、生体内で吸収されるため異物として残存することがなく、また、薬剤を混合することにより、薬剤の局

所濃度を高めるなどドラッグデリバリーのキャリアとしての機能も付与することが可能である。リン酸化プルランを徐放化キャリアとすることで、細胞の足場と増殖分化因子の徐放化を可能とした新規骨組織再生誘導が実現できると考えられる。

これまで Tissue Engineering による組織の再生における細胞ソースには、骨髄由来の間葉系幹細胞が用いられてきた。骨髄由来の細胞を用いることの安全性と有効性の確認はできているものの、細胞の増殖・分化能に個体差が大きく、また培養操作には多大の労力と費用がかかる。また、臨床応用を考慮した場合、骨髄の採取には肉体的、精神的負担が大きい等の問題が存在する。細胞ソースとして再生医療への応用が期待される幹細胞には、あらゆる組織に分化することが可能なES細胞が知られている。しかし、ES細胞は受精卵を破壊することにより作製されるため、その利用については生命倫理的問題が伴う。一方、山中らにより報告がなされたマウスiPS細胞は、マウス線維芽細胞にOct3/4、Klf4、Sox2、c-Mycの四因子を遺伝子導入することにより作製され、ES細胞と同じく種々の組織へ分化できる多能性を有した細胞である(Takahashi and Yamanaka, Cell, 2006)。すでにヒトiPS細胞も樹立され(Takahashi et al., Cell, 2007)、現在iPS細胞を用いた再生医療の実現に向けた研究が活発に行われている。iPS細胞から誘導した神経堤様細胞(NCLC)は、増殖能と多分化能をもち、組織幹細胞としての性質を備えていることが知られている(Otsu K et al. Stem Cells Dev. 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の足場(scaffold)として、骨再生促進効果を有し、すでに臨床応用されているTCP(オスフェリオン)を使用する。また、増殖分化因子としては、すでに臨床応

用の実績があり骨芽細胞の増殖を促進する作用のある線維芽細胞成長因子(FGF)を使用し、iPS 細胞から誘導した神経堤様細胞(NCLC)と徐放化キャリアとしてのリン酸化プルランが骨再生へ及ぼす影響を動物実験にて検証する。

3. 研究の方法

1) マウス iPS 細胞の培養と神経堤様細胞(NCLC)の誘導

Otsu らの報告(Otsu K et al. Stem Cells Dev. 2012)に準じて、iPS 細胞から神経堤様細胞(neural crest-like cell, NCLC)を誘導する。1.0×10⁶ 個のマウス iPS 細胞(mouse iPS cell line iPS-MEF-Ng-20D-17; RIKEN BRC, Tsukuba, Japan)を SNL feeder 細胞上に播種し、iPS 培地を用いて培養する。コロニーを形成し、サブコンフルエントに達したマウス iPS 細胞を 0.25% trypsin/0.53 mM EDTA を用いて回収し、0.1%ゼラチンを用いてコーティングした 60 mm ディッシュ上に 10.5×10⁴ 個の細胞を播種し、1000 U/ml mouse leukemia inhibitory factor を添加した iPS 培地を用いて培養を行なう。コロニーを形成し、サブコンフルエントに達したマウス iPS 細胞を 0.25% trypsin/ 0.53 mM EDTA を用いて剥離し、4 ml 中に 1.0×10⁶ 個の細胞を含む懸濁液を 60 mm の非接着性ディッシュに播種する。神経誘導培地を用いて培養し、2 日後に培地交換を行い、さらに 2 日間培養して神経外胚葉性のスフェロイドを形成する。形成されたスフェロイドを 60 mm のフィブロネクチンコートディッシュに播種し、神経誘導培地を用いて、8 日から 10 日間培養する。スフェロイドから NCLC がアウトグロースしたところで、パスツールピペットを用いて実体顕微鏡下でスフェロイドを除去する。サブコンフルエントに達した NCLC を 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA を用いて回収し、継代を行なう。

2) TCP scaffold と NCLC 複合体の作製 scaffold として、TCP(オスフェリオン®)を、マウス頭蓋骨欠損部 1 つあたり 13mg 使用する。継代した NCLC をセルカウントし、メディアウム 260 μl 中に 26 万細胞が含まれるように調整する。その後チューブに TCP と NCLC を含んだメディアウムを入れ 5 日間培養する。1 日、3 日目にはメディアウムを交換する。5 日経過後、メディアウムを吸い取り NCLC が周囲に付着した TCP 顆粒をマウス頭蓋冠左右に形成した欠損部に埋入する。

3) マウス頭蓋骨欠損モデルに様々な組み合わせの TCP scaffold、NCLC、増殖分化因子、リン酸化プルランを埋入し、新生骨形成過程を動物用 CT、組織定量的、遺伝組織学的に評価する。

実験動物として 6 週齢マウスを 64 匹用い、マウス頭蓋骨欠損モデルを作製する。直径 4.8mm のトレフィンバーを用いて、左右の頭蓋骨に円形の骨欠損を作製する。欠損部に下記の組み合わせの材料を埋入する。埋入後 4、12 週に各群から 2 匹ずつ屠殺を行い、動物用 CT 撮影後、抜歯窩および歯周組織の凍結ブロックを作製し、非脱灰凍結切片の骨標本を、粘着フィルムを用いた川本法によって作製する。切片を用いて、ピラヌエバ骨染色を行い、欠損部における新生骨量を定量的に評価する。また、*in situ* ハイブリダイゼーションを行ない、欠損部に含まれる細胞が発現している遺伝子の発現の局在を比較する。*In situ* ハイブリダイゼーションにて検出する mRNA は、CTGF、RANKL、OPN、TGF- α とし、骨芽細胞、骨細胞、あるいは破骨細胞が発現する mRNA を細胞レベルで検出する。撮影した動物用 CT から、海綿骨梁幅、海綿骨梁距離、海綿骨梁数、骨密度等の組織学的形態計測を行う。

4) ラット顎裂モデルを用いた効果の検証

実験動物として 4 週齢 Wistar ラットを用い、顎裂モデルを作製する。上記 1 の実験に

て最も効果が認められた組み合わせの骨組織再生誘導補填材において、上記 1-3 と同様の内容、タイムコースで効果の検証を行ない、口腔内の環境（嚥下、咀嚼など）にも耐えられる骨組織再生誘導補填材であることを確認する。

5) ビーグルの口蓋裂モデルを用いた効果の検証

実験動物として 12 か月齢雄性ビーグルを 4 頭用い、コントロール群(顎裂モデル作製のみ、N=2)、骨組織再生誘導補填材埋入群(N=2)として、上図のタイムコース(実験 3)にて、顎裂モデルの作製、材料の埋入を行なう。顎裂モデル作製時、材料埋入時、屠殺時に顎裂部レントゲン撮影を行なう。屠殺後、動物用 CT を撮影し、海綿骨梁幅、海綿骨梁距離、海綿骨梁数、骨密度等の組織学的形態計測を行う。また、顎裂部および歯周組織の非脱灰凍結切片を川本法にて作製し、H-E 染色やピラヌエバ骨染色にて新生骨量を組織定量的に評価する。

6) 再生骨への歯の移動を行なった際の歯周組織の評価

実験動物として 12 か月齢雄性ビーグルを 4 頭用い、顎裂部に再生誘導補填材の埋入を行い、上図のタイムコース(実験 4)にて、再生骨内へ歯の移動を行なう。実験 3 と同様な手法を用いて、再生骨内に矯正的に歯を移動させたときの組織定量的、分子生物学的な評価を行ない、メカニカルストレスが骨再生に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

1) マウス iPS 細胞の培養と神経堤様細胞(NCLC)の誘導

星状の細胞形態を呈する細胞が樹立された。NCLC における神経堤マーカー遺伝子である Pax3、Snai1、および Snai2 の発現をリアルタイム PCR で解析したところ、iPS 細胞に比べてそれらの発現が大きく亢進したことが

示された。また、神経堤マーカーである p75NTR および HNK-1 の発現を免疫蛍光により解析したところ、NCLC において発現が認められた。これらの結果から、本研究においてマウス iPS 細胞から樹立した NCLC は、NCC としての形質を有することが示された。

2) マウス頭蓋骨欠損モデルの動物用 CT、組織切片による評価

マウス頭蓋骨欠損部に、TCP、TCP+NCLC、TCP+MC3T3、の各材料を埋入した10週後、TCP+NCLC群はTCP+MC3T3群に比較して欠損部の直径の減少が大きく、治癒傾向が強いことが示された。また、TCP+MC3T3群は埋入4週目までCT値の増加が認められるが、その後減少し、埋入10週後には、TCP+NCLC群の方が高いCT値となった。また、組織切片においても動揺の傾向が認められた。

3) ラット抜歯窩の動物用CTによる評価

ラット抜歯窩における研究成果として、材料埋入 21日後、リン酸三カルシウムおよびリン酸化プルランを埋入した群の CT 値が他の群(対照群、抜歯のみの群、リン酸化プルランのみ埋入した群)と比較して高い傾向があるという結果が得られた。

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 6 件)

1) Takeshita N, Hasegawa M, Sasaki K, Seki D, Seiryu M, Miyashita S, Takano I, Oyanagi T, Miyajima Y, Takano-Yamamoto T. In vivo expression and regulation of genes associated with vascularization during early response of sutures to tensile force. J Bone Miner Metab.2017.35(1):40-51. 査読有. DOI: 10.1007/s00774-016-0737-z.

2) Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Fatemeh G, Fukunaga T, Seiryu M, Daimaruya T, Takeshita N, Kamioka H, Adachi T, Ida H, Mayama A. Synergistic acceleration of experimental tooth movement by supplementary high-frequency vibration applied with a static force in rats. Sci

Rep.2017. Oct 25;7(1).13969. 査読有 .DOI: 10.1038/s41598-017-13541-7.

3) Takano-Yamamoto T, Fukunaga T, Takeshita N. Gene Expression Analysis of CCN Protein in Bone Under Mechanical Stress. Methods Mol Biol.2017.1489:283-308. 査読有 .DOI: 10.1007/978-1-4939-6430-7_26

4) Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C. Scleraxis and Osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. Development.2015.142:787-796. 査読有 .DOI: 10.1242/dev.116228.

5) Deguchi T, Seiryu M, Daimaruya T, Garetto LP, Takano-Yamamoto T, Roberts WE. Decreased alveolar bone turnover is related to the occurrence of root resorption during experimental tooth movement in dogs. Angle Orthod.2015.85(3):386-393. 査読有 .DOI: 10.2319/021714-117.1.

6) Seki D, Takeshita N, Oyanagi T, Sasaki S, Takano I, Hasegawa M, Takano-Yamamoto T. Differentiation of odontoblast-like cells from mouse induced pluripotent stem cells by Pax9 and Bmp4 transfection. Stem Cells Transl Med.2015.4(9):993-997. 査読有 .DOI: 10.5966/sctm.2014-0292.

〔学会発表〕(計 10 件)

1) Takano-Yamamoto T. Tooth movement and mechanical stress-Role of osteocytes and osteoimmune factors. The 20th Annual Meeting of Taiwan Orthodontic Society, (招待講演)(国際学会)2017.

2) 井田裕人、清流正弘、山本照子. 歯科矯正用アンカースクリューを用いて、上顎歯列の正中偏位を改善した症例 第33回東北矯正歯科学会 2017.

3) 川津正慶、竹下信郎、吉田倫子、木村晴地、清流正弘、滝本晶、宿南知佐、山本照子 牽引力負荷された歯根膜の初期反応における scleraxis の発現機序と機能の解析 第76回日本矯正歯科学会 2017.

4) 宮下俊郎、長谷川正和、清流正弘、山本照子. 臼歯の挺出および下顎歯列の遠心移動により骨格的・機能的不調和を改善した骨格性 III 級症例 第76回日本矯正歯科学会 2017.

5) 吉田倫子、清流正弘、山本照子. 下顎前歯先天性欠如および上顎前歯部に叢生を伴う骨格性 I 級症例 第76回日本矯正歯科学会 2017.

6) 小林 孝敬、清流 正弘、山本 照子. セルフライゲーションリングブラケットおよび歯科矯正用アンカースクリューの有用性 第76回日本矯正歯科学会 2017.

7) 小林 孝敬、清流 正弘、出口 徹、長谷川 正和、山本 照子. 片側性臼歯部 crossbite 患者と正常咬合者の顎関節円板位置の比較 第76回日本矯正歯科学会 2017.

8) 吉澤 光弘、福永 智広、清流 正弘、黒木 毅、宮島 悠旗、山本 照子. 歯科矯正用アンカースクリューを併用して上顎骨前方牽引を行った骨格性 III 級症例 第76回日本矯正歯科学会 2017.

9) 清流 正弘、真山敦、金原正敬、解良洋平、宮下俊郎、出口徹、山本照子. 歯科矯正用アンカースクリューを併用した上顎骨前方牽引装置の効果について. 第74回日本矯正歯科学会大会. 2015年11月18日～2015年11月20日. 福岡

10) Takano-Yamamoto T. Clinical and Translational Dental Research focused on Orthodontic Tooth Movement. 2015 Goldhaber Award Memory Lecture (招待講演) (国際学会). 2015年10月26日～2015年10月28日. Boston, MA, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清流正弘 (MASAHIRO SEIRYU)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号:80510023

(2) 研究分担者

竹下 信郎 (NOBUO TAKESHITA)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号:50431515

山本 照子 (TERUKO YAMAMOTO)
東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授
研究者番号:00127250

(3) 研究協力者

沖原 巧 (TAKUMI OKIHARA)
吉田 靖弘 (YASUHIRO YOSHIDA)