

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15705

研究課題名(和文) デジタルデザインを応用したiPS細胞の新たな垂直的歯槽骨造成術の開発

研究課題名(英文) Vertical Bone Augmentation Using iPS Cell Constructs with CAD/CAM Dome

研究代表者

矢谷 博文 (Yatani, Hirofumi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：80174530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞の骨形成促進作用を有する化合物として検出されたPKC阻害薬(isoH-7)は、iPS細胞の骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなった。また、CAD/CAMを用いたドーム型チタンメンブレンのモールドデザインを検討し、造成モールドを作製した。さらに、PKC阻害薬を加えて分化誘導を行ったiPS細胞凝集体をマウス背皮下に移植した結果、腫瘍形成を確認したものの、通常誘導と比較して腫瘍の大きさは小さくなった。プロトコールの改良を行うことで、作製した垂直的骨造成モールドと併せた自己由来細胞であるiPS細胞を用いた新たな骨造成方法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that the PKC inhibitor (isoH-7) promotes osteogenic differentiation of iPS cells. We also examined the mold design of dome type titanium membrane using CAD / CAM, and fabricated the mold for vertical bone augmentation. Furthermore, iPS cell aggregates differentiated into osteoblasts by adding PKC inhibitor were transplanted into the back of mouse. As the result, tumor formation was confirmed, but the tumor size became smaller as compared with that induced without PKC inhibitor. It was suggested that by improving the protocol it could be a new bone formation methods using autologous iPS cells combined with the vertical bone augmentation mold.

研究分野：歯科補綴学・再生医学

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

補綴・インプラント歯科治療において、広範囲かつ垂直的な骨欠損部位に対して、安全かつ確実に欠損骨を再生する「垂直的骨造成技術」が求められている。個々の細胞から作製可能な iPS 細胞は、歯槽骨の再生医療に有用であり、申請者らはこれまでに、iPS 細胞が骨髄由来間葉系幹細胞と同様の分化能をもつことを明らかにしてきた。

また、申請者は、ケミカルバイオロジーのアプローチによる、独自に構築した小分子化合物ライブラリースクリーニングシステムを用いた解析から、iPS 細胞の骨形成促進作用を有する化合物の同定にも取り組んでいる。しかしながら、iPS 細胞を歯槽骨造成術に臨床応用するためには、インプラント埋入後、移植材料-インプラント間におけるオッセオインテグレーションを獲得することを可能にする垂直的骨造成技術の開発が必要である。近年、デジタルデンティストリーの進展により、患者個人の骨欠損部に合わせた立体的なスキャフォールドデザインを自在に設計すること(デジタルデザイン)が可能となった。この技術は、スキャフォールドだけでなく、欠損部の垂直的な骨造成を支持するモールドの作製にも応用可能である。以上の学術的背景から、申請者は、骨芽細胞分化を促進する化合物を用いて分化誘導した iPS 細胞と、CAD/CAM により作製した骨欠損部に合わせた骨造成モールドを用いて、垂直的骨造成を行い、オッセオインテグレーションの獲得を評価することで、iPS 細胞が新たな骨移植材料として有用であることを示す大きな可能性を秘めていることに着目し、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケミカルバイオロジーおよびデジタルデザインによる立体的なスキャフォールドの設計によって、iPS 細胞とインプラント体間におけるオッセオインテグレーションの獲得を可能とする垂直的骨造成技術を開発することである。iPS 細胞とインプラント体間、すなわち細胞-チタン間に存在する未知の分子機構を明らかにするとともに、新たな動物実験モデルの確立、さらには歯槽骨造成法の確立につなげていく。

3. 研究の方法

(1) これまで行ってきたケミカルバイオロジーのアプローチによる、独自に構築した小分子化合物ライブラリースクリーニングの結果から同定された小分子化合物が、iPS 細胞および初代骨芽細胞の分化・機能に及ぼす影響を、分子生物学的手法を用いて検討した。また、iPS 細胞の分化誘導に関する三次元培養の至適条件を検討した。

(2) 垂直的骨造成モデルに用いるモールドデザインを CAD/CAM を用いて検討し、骨欠損にあわせたモールドの作製を検討した。

(3) 確立した骨芽細胞分化誘導プロトコルに、同定した化合物を添加して分化誘導した iPS 細胞の骨再生能を、動物実験を用いて検討した。そのため、化合物を含有した iPS 細胞胚様体を培養し、これをマウス背皮下に埋入し、異所性の骨形成能を検討した。

4. 研究成果

(1)

これまで行ってきたケミカルバイオロジーのアプローチによる、独自に構築した小分子化合物ライブラリースクリーニングの結果から、間葉系幹細胞の骨形成促進作用を有する化合物として検出された PKC 阻害薬 (isoH-7) は、骨芽細胞分化誘導実験の結果、骨芽細胞特異的遺伝子の発現を促進し(図 1)、さらに石灰化基質の形成も促進した(図 2)。したがって、iPS 細胞の骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなった。

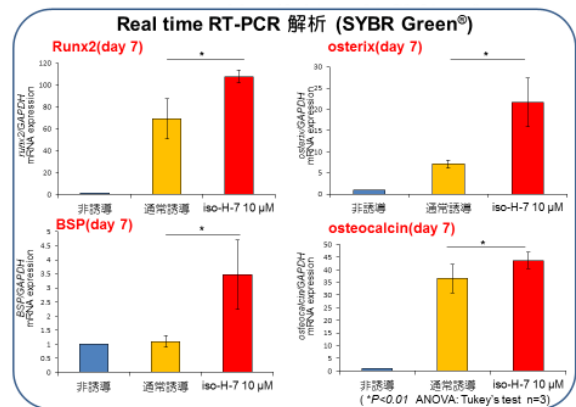


図 1. 化合物が骨芽細胞特異的遺伝子発現に及ぼす影響

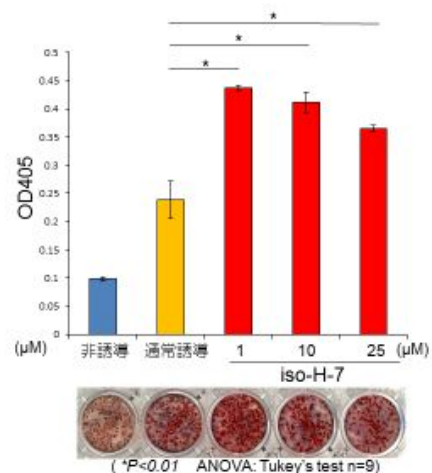


図 2. 化合物が石灰化基質形成に及ぼす影響 (Alizarin Red 染色)

(2)

さらに、垂直的骨造成モデルを確立するため、デジタルデンティストリーのアプローチから、CAD/CAMを用いて、移植および骨造成に適したドーム型チタンメンブレンのモールドデザインを検討し、造成モールドを作製した(図3)。

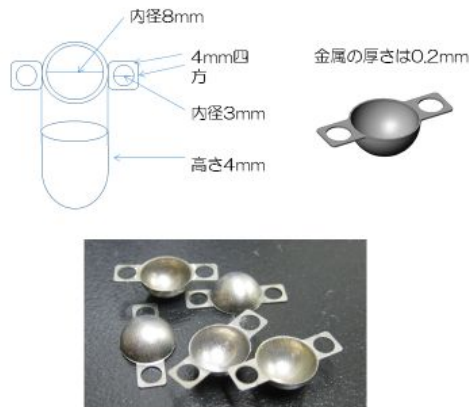


図3. CAD/CAMを用いたチタンドームの作製

(3)

これらの結果を踏まえて動物実験に移行し、これまでに確立しているiPS細胞の骨芽細胞分化誘導方法に、PKC阻害薬を加えて分化誘導を行ったiPS細胞凝集体をマウス背皮下に移植した結果、腫瘍形成を確認した。しかし、通常誘導と比較して、腫瘍の大きさは小さくなった(図4)ことから、プロトコルの改良を行うことで、自己由来細胞であるiPS細胞を用いた新たな骨造成方法となる可能性が示唆された。

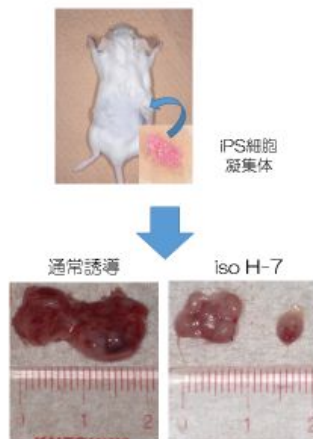


図4. iPS細胞凝集体の移植実験

いっぽう、作製した垂直的骨造成モールドは、既存の骨補填材の経時的評価方法としても応用できる可能性があり、今後の研究の発展が期待される。

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 1 件)

1.

Okawa H, Kayashima H, Sasaki J, Miura J, Kamano Y, Kosaka Y, Imazato S, Yatani H, Matsumoto T, Egusa H
Scaffold-Free Fabrication of Osteoinductive Cellular Constructs Using Mouse Gingiva-Derived Induced Pluripotent Stem Cells.
Stem Cells Int.2016

〔学会発表〕(計 2 件)

1.

松岡秀, 萱島浩輝, 矢谷博文
PKC inhibitor によるマウス骨髄由来間葉系幹細胞およびiPS細胞における骨芽細胞分化誘導能の検討
第120回大阪大学歯学会例会
2015年7月23日
大阪大学(大阪府吹田市)

2.

松岡秀, 萱島浩輝, 盛林昭仁, 山本治毅, 江草宏, 矢谷博文
骨髄由来間葉系幹細胞およびiPS細胞の骨芽細胞におけるPKC阻害薬剤の影響
第125回日本補綴歯科学会学術大会
2016年7月9日
石川県立音楽堂(石川県金沢市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢谷博文(YATANI HIROFUMI)

大阪大学大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 80174530

(2)研究分担者

江草宏(EGUSA HIROSHI)

東北大学大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 30379078

(3) 研究分担者

萱島浩輝 (KAYASHIMA HIROKI)

大阪大学大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50632121