

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15797

研究課題名(和文) iPS細胞の軟骨内骨化を利用した顎骨再生技術の開発

研究課題名(英文) Development of a method for the endochondral alveolar bone tissue engineering using iPS cells

研究代表者

江草 宏 (Egusa, Hiroshi)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30379078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた顎骨再生医療の開発は、より審美・機能的な補綴歯科治療を可能にするものと期待されている。本研究では、広範囲骨再生部位における軟骨内骨化の利点に着目し、試験管内でiPS細胞から骨/軟骨様細胞塊を作製する技術の開発を目的とした。本研究により、軟骨細胞および骨芽細胞分化誘導因子を併用することで、マウスiPS細胞の胚様体から、軟骨細胞/骨芽細胞の分化程度の割合を制御しながらハイブリッド軟骨/骨様細胞塊が作製可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A strategy of induced pluripotent stem (iPS) cell-based alveolar bone regeneration is expected to improve treatment outcome in prosthetic treatments. We focused on possible advantage in endochondral bone regeneration in the large bone defect. The aim of this study was to develop a method to fabricate bone/cartilage-like cell constructs using iPS cells. We found that combination use of chondrogenic and osteogenic induction factors could guide mouse iPS cell embryoid bodies into hybrid bone/cartilage-like cell constructs on the manipulation of a ratio in degrees of chondrocyte/osteoblast differentiation.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生歯科補綴学 iPS細胞 軟骨内骨化

1. 研究開始当初の背景

骨増生術における細胞移植治療は、より審美・機能的な補綴歯科治療を可能にするものと期待されている。一方、iPS 細胞は無限の増殖能と多分化能を有することから、再生歯科医療に用いる幹細胞として期待が寄せられている。

従来の顎骨再生アプローチは、骨芽細胞の石灰化能に依存した「膜性骨化」を基本としていた。しかし、広範な骨欠損では細胞は低酸素状態に陥りがちであり、血液を供給する血管新生も困難であるため、この骨化様式による再生治療には限界があるかもしれない。これに対して本研究では、低酸素状態が有利に作用する「軟骨内骨化」に着目し、iPS 細胞を用いて軟骨と骨の性質を併せ持った細胞移植材料の作製を検討する。

2. 研究の目的

本研究は、軟骨内骨化を模倣して試験管内で iPS 細胞から骨/軟骨様細胞塊を作製する技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞を用いた軟骨/骨芽細胞塊の作製

Egusa らの方法に従い、マウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞から胚葉体を作製し (Egusa H, Stem Cells Dev. 2014)、骨芽細胞分化誘導培地を用いた浮遊培養条件下で細胞塊形成を誘導した。

細胞塊の薄切切片を作成し、アルシアンブルー染色を用いて軟骨基質の形成を、免疫蛍光染色を用いてタイプ II コラーゲン (Col II)、タイプ X コラーゲン (Col X)、低酸素誘導因子 (HIF-1) の発現を評価した。また、骨 (石灰化) 基質形成をフォンコッサ (VK) 染色ならびにオステオカルシン (OCN) の免疫蛍光染色により観察した。

(2) スタチンが iPS 細胞由来軟骨/骨芽細胞塊に及ぼす影響

高脂血症治療薬であるスタチンには、骨芽細胞の分化を促進する作用 (Mundy et al, Science, 1999) に加え、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した軟骨細胞の細胞増殖と軟骨形成を促進する作用が報告されている (Yamashita A et al, Nature, 2014)。そこで、上記 (1) の細胞塊誘導をスタチン存在下で行い、その骨芽細胞/軟骨細胞塊の形成に及ぼす影響について、(1) と同様の方法を用いて検討した。

(3) TGF- β 3 が iPS 細胞由来軟骨/骨芽細胞塊の形成に及ぼす影響

幹細胞に対する軟骨への分化誘導因子の一つに TGF- β 3 がある。上記 (1) (2) では、iPS 細胞胚様体に骨芽細胞分

化誘導培地を用いることで軟骨細胞と骨芽細胞が混在する細胞構造体を誘導した。続いて、この iPS 細胞由来軟骨/骨芽細胞塊の作製に、TGF- β 3 を段階的に用いることで、最終的に得られる細胞塊の軟骨/骨様形質のバランスにどのような影響が現れるかを検討した。

マウス iPS 細胞胚様体を、浮遊環境で以下の 3 条件を用いて分化誘導した。

TGF- β 3 存在下で 20 日間培養

TGF- β 3 存在下で 10 日間培養後、骨芽細胞分化誘導培地で 10 日間培養

スタチン添加骨芽細胞分化誘導培地で 20 日間培養

分化誘導終了時に回収した試料について、軟骨基質の形成および石灰化基質の形成をアルシアンブルー染色および VK 染色を用いて観察した。

(4) iPS 細胞胚様体を用いた軟骨分化誘導の最適化

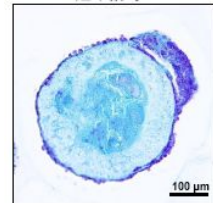
マウス iPS 細胞胚様体から軟骨細胞塊を誘導する方法を最適化するため、播種する細胞数および培地交換時における培地の交換量について検討した。初期分化誘導には 96 穴プレートを用い、その後の分化誘導には 6 穴プレートを用いた。軟骨誘導培地は、マウス ES 細胞から軟骨細胞塊を誘導する方法 (Jukes JM et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2008) を参考に用意した。

分化誘導終了時に得られた細胞塊から薄切切片を作成し、HE 染色およびトリジンブルー染色で細胞形態を観察した。

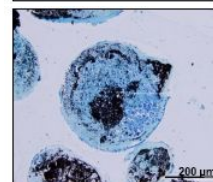
4. 研究成果

(1) iPS 細胞を用いた軟骨/骨芽細胞塊の作製

iPS 細胞胚様体を骨芽細胞培地で 50 日間浮遊培養した結果、表層、外層および中心層から構成される細胞構造体が形成された。中心層には、アルシアンブルー染色陽性の細胞外基質を認め (右図) Col II および HIF-1 に染色された細胞が存在した。



また、中心層および外層には、OCN 陽性および石灰化基質の形成 (VK 染色陽性) を示す部位も認めた (右図)。

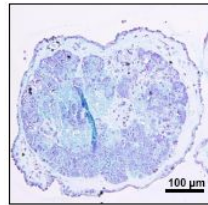


本培養条件で培養したマウス iPS 細胞胚様体は、層構造を有する細胞構造体を形成するが、その中心部では低酸素状態から軟骨様細胞へ分化した細胞および骨芽細胞が混在し、中心壊死に至る過

程で石灰化を呈した可能性が示唆された。

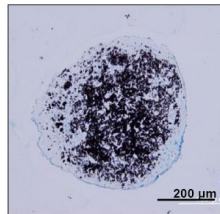
(2) スタチンが iPS 細胞由来軟骨/骨芽細胞塊に及ぼす影響

iPS 細胞をスタチン存在下で上記細胞構造体を 50 日間誘導した結果、外層の幅は小さいものの、(1)と同様の層構造を示す細胞塊が得られた(右図)。



表層の単層細胞は Col I、Col X および HIF-1 を高発現しており、軟骨細胞様の形質をもつ細胞へ分化した可能性が示唆された。中心層では Col I および HIF-1 を強く発現し、アルシアンブルー染色弱陽性の領域を認めた。

また、スタチンの添加はすべての層における OCN の発現を著明に促進し、中心層における石灰化基質の形成を増強した(右図)。

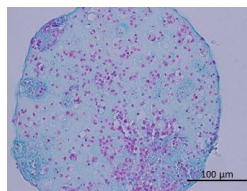


以上の結果から、マウス iPS 細胞由来胚様体を骨芽細胞分化誘導培地中で浮遊培養することで、軟骨細胞様細胞および石灰化基質を含む細胞構造体の作製が可能であることが明らかとなった。また、スタチンはこの細胞構造体の表層における軟骨様細胞への分化、内層における骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された。

(3) TGF-β3 が iPS 細胞由来軟骨/骨芽細胞塊の形成に及ぼす影響

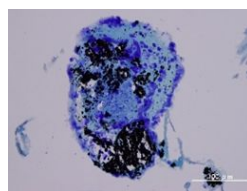
iPS 細胞胚様体は ~ すべての培養条件において球状の充実性の細胞塊を形成した。誘導 20 日後の細胞塊フェレ径を測定した結果、分化誘導に TGF-β3 を用いた、の細胞塊サイズはよりもやや大きくなる傾向を示した。

薄切切片の観察から、の細胞塊内部にはアルシアンブルー染色陽性の部位および肥大した細胞の存在を認めた(右図)。

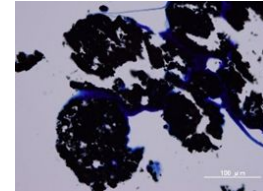


VK 染色陽性の部位は認めなかった。

細胞塊の外層および中心層にはアルシアンブルー染色陽性の部位を認めたが、肥大した細胞は少数であった。一方、細胞塊内部には VK 染色陽性の部位がまばらに存在した(右図)。



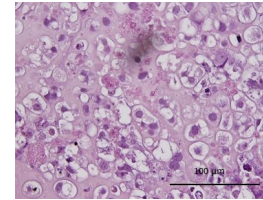
の細胞塊では、アルシアンブルー染色陽性領域および肥大した細胞はわずかに存在するが、多くの部分が VK 染色陽性の石灰化像を呈した(右図)。



以上の結果から、マウス iPS 細胞胚様体の骨芽細胞分化誘導に TGF-β3 を用いた軟骨細胞誘導を加えることで、異なる石灰化の程度を呈する軟骨/骨芽細胞塊の作製が可能であることが示された。

(4) iPS 細胞胚様体を用いた軟骨分化誘導の最適化

分化誘導終了時、細胞塊内部にトリジンブルー陽性を示す多くの軟骨様細胞を認めた。播種した細胞数が少ない場合には、培地交換時の交換量の影響はほとんど認めなかった。(右図: HE 染色像)。



播種した細胞数が多い場合には、培地交換を全量にすることで軟骨様細胞の数はやや増える傾向を認めた。

以上の結果から、iPS 細胞を胚様体から直接分化誘導することで、スキャフォールドを用いない軟骨/骨様細胞塊が作製できる可能性が示された。また、この細胞塊の性質は、添加因子、播種する細胞数等の培養条件を調整することで、軟骨様から石灰化基質を多く含む骨様の形質に勾配をもって制御することが可能であることが示された。

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 2 件)

Yamada M, Egusa H: Current bone substitutes for implant dentistry. J Prosthodont Res, 62(2): 152-161, 2018. (査読有)

doi: 10.1016/j.jpor.2017.08.010.

Niibe K, Suehiro F, Oshima M, Nishimura M, Kuboki T, Egusa H: Challenges for stem cell-based "regenerative prosthodontics". J Prosthodont Res, 61(1):3-5, 2017. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2016.09.001>

〔学会発表〕(計 9 件)

江草 宏:インプラント臨床における再

生医療の現状と挑戦, 第 37 回 日本口腔インプラント学会 近畿・北陸支部学術大会 特別講演, 2017 年 12 月 3 日(大津市).

江草 宏: iPS cell-based strategies in bone tissue engineering, 第 65 回 国際歯科研究学会 日本部会 (JADR) 学術大会シンポジウム “Advances in iPS cell research and its application to dental medicine” 2017 年 11 月 19 日(東京).

江草 宏: Emerging approaches for “regenerative prosthodontics”, 2017 Biennial Joint Congress of JPS-CPS-KAP 招待講演, 2017 年 10 月 20 日 (Wenzhou, China).

江草 宏: iPS 細胞を用いた骨再生医療戦略, 東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ(日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会)招待講演, 2017 年 9 月 25 日(仙台市).

江草 宏: iPS cell-based strategies in bone tissue engineering, The 2nd Annual Academic Conference of Society of Dental Research Administration, CSA 招待講演 2017 年 8 月 25 日(Beijing, China)

江草 宏: 再生医療の補綴歯科治療への展開, 第 16 回 日本再生医療学会総会シンポジウム「歯科再生医療推進ネットワーク協議会の立ち上げと歯科再生医療の今後の展開」, 2017 年 3 月 8 日(仙台市).

江草 宏: 再生歯科医療を材料と生体から理解する, 大阪口腔インプラント研究会例会 シンポジウム「組織再生の最前線」招待講演, 2016 年 11 月 13 日(大阪市).

江草 宏: iPS 細胞が描く歯科医療の未来～これからの再生歯科医療への期待と課題～, 第 69 回 東北地区歯科医学会特別講演, 2016 年 11 月 5 日(仙台市).

江草 宏: iPS 細胞を用いた骨組織再生技術の開発, 第 59 回 春季日本歯周病学会学術大会シンポジウム「大規模歯周組織再生を目指した細胞治療開発の新展開」, 2016 年 5 月 20 日(鹿児島市).

齋藤 正寛 (SAITO, Masahiro)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 40215562

福本 敏 (FUKUMOTO, Satoshi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 30264253

(4) 研究協力者

大川 博子 (OKAWA, Hiroko)
東北大学・大学院歯学研究科・非常勤講師
研究者番号: 00781296

河阪 幸宏 (KOSAKA, Yukihiro)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院生
研究者番号: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

鎌野 優弥 (KAMANO, Yuya)
東北大学病院・助教
研究者番号: 70757260

(3) 連携研究者