

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20635

研究課題名(和文)酸化ストレス防御能を有するヒトiPS細胞由来の歯根膜シートの開発と歯周組織再生

研究課題名(英文) Differentiation of iPS cells into periodontal ligament cells for periodontal tissue regeneration

研究代表者

後藤 まき (Goto, Maki)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20771108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜は生理的条件下において歯の支持、血管網による栄養の供給、感覚の受容、歯周組織の維持・再生に重要な役割を果たしている。歯周病により歯周組織が破壊されると、自然治癒は見込めず、重度の歯周組織の破壊が生じた場合には抜歯が不可避となり、患者の審美性や咬合機能が著しく損なわれる。近年、歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再生が期待されている。しかし、将来この技術を広く臨床応用するためには、いかに少ない患者への侵襲で必要十分量の安全な歯根膜細胞を確保するかという細胞ソースの課題を解決しなければならない。そこで本研究課題では、歯周組織の再生を目指した、iPS細胞由来歯根膜細胞樹立方法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、歯周組織の再生に用いるiPS細胞歯根膜細胞樹立に応用可能な前駆細胞である神経堤細胞の分化誘導方法が開発された。これにより、歯周組織再生における細胞ソースの課題を克服し、多くの患者に歯周組織の再生による次世代の治療が提供できることとなり、将来の人類の健康増進に寄与する点で大きな意義を持ち、本研究が与える科学的インパクトは非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Periodontal ligament has important role in tooth support, blood supply, sensing, maintenance and regeneration of periodontal tissues. Break down of the periodontal tissues due to periodontitis and other reasons can result in undesirable tooth extraction. In the recent years, it is expected that the regeneration of periodontal tissues using periodontal ligament cell sheet. To achieve this regenerative therapy, large amount of periodontal ligament cells is necessary. In the present study, a novel method to establish the iPS cell-derived periodontal ligament cells has been developed.

研究分野：矯正歯科

キーワード：iPS細胞 歯周組織再生 神経堤細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、歯肉、セメント質、歯根膜、および歯槽骨の4種の組織で構成される。そのうち歯根膜は、歯槽骨とセメント質の間に介在する線維性結合組織である。歯根膜は、歯を顎骨内に固定するだけでなく、咬合力等のメカニカルストレスに対する緩衝作用や、外的刺激を感受する感覚装置としての機能を有する。また、歯根膜には間葉系幹細胞が存在し、それらが線維芽細胞、骨芽細胞、およびセメント芽細胞に分化することから、歯根膜は幹細胞ニッチとして考えられる。さらに、矯正歯科治療における歯の移動は、矯正装置が発現するメカニカルストレスを歯根膜が感受し、シグナリングの活性を介して細胞の増殖・分化を亢進し、牽引側における骨形成と圧迫側における骨吸収を促すことにより達成される。以上のことから歯根膜は、周囲微小環境の変化に適応して歯周組織の恒常性を維持する重要な役割を担う組織である。

歯周病により歯周組織が破壊されると自然治癒は見込めず、重度の歯周組織の破壊が生じた場合には抜歯が不可避となり、患者の審美性や咬合機能が著しく損なわれる。これまで、失われた歯周組織の再生を促す治療方法として、遮断膜を用いて上皮細胞の増殖を抑制しながら、歯周組織欠損部に歯根膜や歯槽骨の形成を促す組織再生誘導法 (guided tissue regeneration, GTR) や、ブタエナメル由来タンパク製剤であるエムドゲインが知られている。しかし、これらの方法は、人口材料や他種生物材料を使用するため、免疫反応による移植後の拒否反応のリスクがある。一方、間葉系幹細胞を含み歯周組織の恒常性維持を担う歯根膜を、歯周組織再生に応用する研究が進められてきた。2011年に東京女子医科大学にて「自己培養歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再建」に関する臨床研究が開始され、既に10症例にて細胞シートの移植が行われ安全性と有効性が確認された。これにより患者自身の歯根膜細胞を用いた歯周組織の再生医療を目指す研究が大きく前進した。

カリエスや歯周病により失った歯の治療の一つにインプラントがある。従来のインプラントは歯槽骨と直接接合するため歯根膜が存在しない。そのためインプラントによる喪失歯の治療では、感覚やメカニカルストレスに対する緩衝作用などの歯根膜の機能の回復は不可能である。研究代表者が所属するグループは、ハイドロキシアパタイト処理したチタン製インプラント体に歯根膜の発生学的由来である歯小嚢を付与したバイオハイブリッドインプラントを、マウス顎骨に移植した結果、インプラント体周囲にシャーパー線維を含んだセメント質、天然の歯根膜と同様のコラーゲンを含んだ歯根膜および石灰化した歯槽骨が誘導されることを明らかにした (Oshima et al., Sci Rep, 2014)。さらにこのバイオハイブリッドインプラントにメカニカルストレスを負荷することにより天然歯同様に移動すること、その際に適切な歯の機能に重要な痛覚を感受することが示された。この報告により、歯根膜機能を有したバイオハイブリッドインプラントの作製が可能であることが示された。

これらの歯根膜シートを用いた歯周組織再生と歯根膜が付与されたバイオハイブリッドインプラントは、次世代の歯科医療技術として、社会から大きな期待が寄せられている。しかし、将来これらの技術を広く臨床応用するためには、いかに少ない患者への侵襲で必要十分量の安全な歯根膜細胞を確保するかという細胞ソースの課題を解決しなければならない。移植細胞に対する免疫反応を回避するために、患者自身の歯根膜細胞を用いた自家移植が考えられるが、獲得できる細胞数、外科的侵襲、およびウイルスや細菌の感染等の問題がある。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、無限の増殖能と多分化能を有し、倫理的問題が少ないことから、再生医療の有効な細胞ソースである。Duan ら (J cell Physiol., 2011) は、iPS 細胞とエナメル基質誘導体ゲルを使用することによって、歯槽骨、セメント質および歯根膜を再生した。これにより、iPS 細胞が歯周組織再生の細胞ソースとなり得ることが示された。また現在、京都大学 iPS 細胞研究所が中心となり、iPS 細胞ストックプロジェクトが進められている。このプロジェクトでは、拒絶反応の少ない HLA 型をホモに持つ iPS 細胞細胞が備蓄される。それらの iPS 細胞を用いることにより、患者に侵襲を与えることなく、iPS 細胞由来歯根膜細胞シートを用いた歯周組織再生とバイオハイブリッドインプラントによる治療のための細胞ソースを十分量得ることができる。しかし、それらの実現のためには、iPS 細胞から歯根膜細胞への決定的な分化誘導方法の確立が必須である。

以上の背景のもと、研究代表者は、歯周組織の再生とバイオハイブリッドインプラントへの応用を目指して、歯根膜細胞シートの作製に使用可能なヒト iPS 細胞を由来とした歯根膜細胞の樹立を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞を由来とした歯根膜細胞の樹立を目指して、1) 種々のヒト歯胚組織から単離した細胞を用いた iPS 細胞の樹立、2) 樹立したヒト iPS 細胞から歯根膜細胞への分化誘導方法の確立、を目的として研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### (1)ヒト歯胚から単離した細胞を用いた iPS 細胞の樹立

研究代表者の所属するグループは過去に、Okita ら (Nat Methods, 2011) の方法に従い、京都大学 iPS 研究所でサブクローニングされた iPS 細胞作製用エピソーマルプラスミド (pCXLE-hOCT3/4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) をヒト歯根膜細胞に遺伝子導入することにより、iPS 細胞を樹立した。本研究では、iPS 細胞の由来となる細胞の種類の違いにより、歯根膜細胞への分化能が異なる可能性を考慮し、さらにヒト歯小囊と歯乳頭から単離した細胞へ iPS 細胞作製用エピソーマルプラスミドを京都大学 iPS 細胞研究所のプロトコールに従ってエレクトロポレーションにより遺伝子導入し、iPS 細胞を樹立した。

### (2)ヒト iPS 細胞から神経堤様細胞への誘導

樹立したヒト iPS 細胞を、SNL 細胞をフィーダー細胞として用いて維持培養したのち、京都大学 iPS 細胞研究所のプロトコールに従ってフィーダーフリーの条件で培養した。次にフィーダーフリー条件下で培養したヒト iPS 細胞を非接着性培養プレートに播種し、2日間培養することにより neural sphere の発生を形成した。形成したヒト iPS 細胞由来 neural sphere を接着性のある培養ディッシュに移し、神経堤様細胞のアウトグロースを促した。

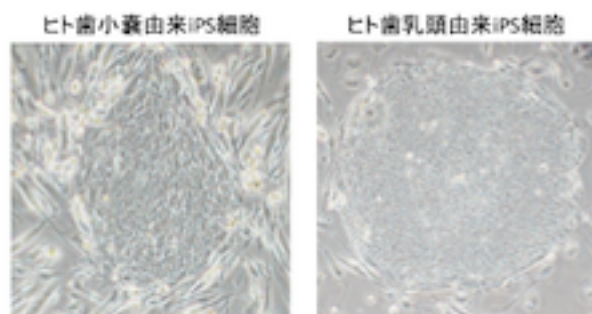
### (3)ヒト iPS 細胞由来神経堤様細胞の characterization

得られた ヒト iPS 由来神経堤様細胞が、神経堤細胞として性質を持つか否か確認するための characterization を行なった。ヒト iPS 由来神経堤様細胞から RNA を精製し、神経堤細胞マーカーと知られる Pax3, Snai1, Snai2 の発現を RT-PCR により解析した。

## 4. 研究成果

### (1)ヒト歯胚から単離した細胞を用いた iPS 細胞の樹立

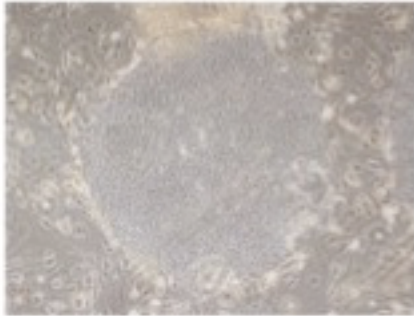
ヒト歯小囊と歯乳頭から単離した細胞に、京都大学 iPS 研究所でサブクローニングされた iPS 細胞作製用プラスミドをエレクトロポレーションにより遺伝子導入して iPS 細胞樹立を行なった結果、iPS 細胞のコロニー形成が認められた。



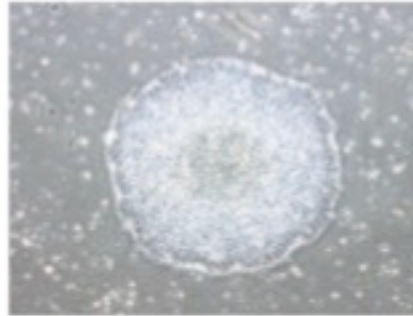
## (2) ヒト iPS 細胞から神経堤様細胞への誘導

樹立したヒト iPS 細胞を、フィーダーフリーの条件で培養した。その結果、フィーダー細胞を用いた条件の iPS 細胞と類似した形態を維持しながら維持培養を行うことに成功した。

On feeder

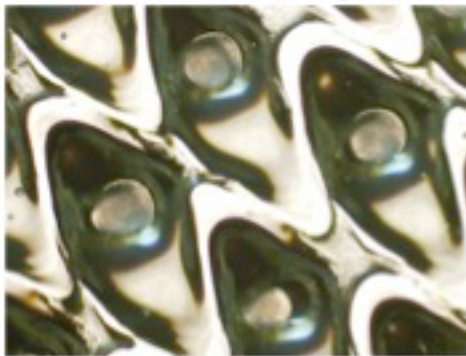


Feeder-less

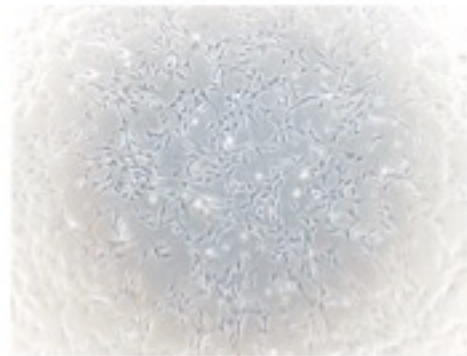


次にフィーダーフリー条件下で培養したヒト iPS 細胞を非接着性培養プレートに播種し、neural sphere の発生を形成した。その結果、均一なサイズの多数の neural sphere の誘導に成功した。形成したヒト iPS 細胞由来 neural sphere を接着性のある培養ディッシュに移し、神経堤様細胞のアウトグロースを促し、さらに得られた細胞を継代した結果、過去に報告された神経堤様細胞の形態的特徴を有する細胞が樹立された。

ヒトiPS細胞由来neural sphere



ヒトiPS細胞由来神経堤細胞



## (3) ヒト iPS 細胞由来神経堤様細胞の characterization

(2)で得られたヒト iPS 細胞由来神経堤様細胞の characterization を RT-PCR により行なった結果、神経堤様細胞への分化誘導を行わなかった iPS 細胞に比べて、ヒト iPS 細胞由来神経堤様細胞では、神経堤細胞マーカーである Pax3, Snai1, Snai2 の高い発現が認められた。これにより、今後ヒト iPS 細胞由来歯根膜細胞を誘導するための前駆細胞樹立に成功したと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

なし