

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02985

研究課題名(和文) ES細胞を基軸とした歯周組織再生担当細胞の分化制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of differentiation control from human embryonic stem cells to responsible cells for periodontal regeneration

研究代表者

岩田 隆紀 (Iwata, Takanori)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60431946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多能性幹細胞であるヒトES細胞から神経堤細胞に効率よく分化技術開発、さらには神経堤細胞から間葉系幹細胞に効率よく分化させる技術開発を実施した。神経堤細胞への分化誘導はある程度確立されているものの、更なる高効率を目指すために、各種細胞外マトリックスを用いた。とある細胞外マトリックスを用いることで、従来に比べて高効率に神経堤細胞を誘導できる培養条件を決定した。また、神経堤細胞から間葉系幹細胞への分化は従来法を用いて実施した。本細胞とすでに私共で保持しているPDL-MS細胞株のトランスクリプトーム解析の結果を比較検討することで歯周組織再生に適した細胞の遺伝子プロファイルの指標を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は、本邦において歯を失う最大の原因である。我々は、歯科領域で日常的に抜歯されている親知らずなどの不働歯から歯根膜由来間葉系幹細胞(PDL-MS細胞)を単離し、重度歯周病患者の治療に応用することで、その安全性と有効性を示してきた。本研究では、無限の増殖能を持つヒトES細胞に着目し、ES細胞から最終分化産物であるPDL-MS細胞を分化誘導するための手法とその過程を詳細に検討することにより、ES細胞由来PDL-MS細胞を臨床応用するための基礎医学的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed technologies for efficient differentiation of pluripotent stem cells, human ES cells, into neural crest cells, and also for efficient differentiation of neural crest cells into mesenchymal stem cells. Although induction of differentiation into neural crest cells has been established to some extent, various extracellular matrices were used to achieve even higher efficiency. By using a certain extracellular matrix, we determined the culture conditions under which neural crest cells can be induced more efficiently than in the past. Differentiation of neural crest cells into mesenchymal stem cells was performed using conventional methods. By comparing the results of transcriptome analysis of these cells with those of the PDL-MS cells already maintained in our laboratory, we obtained an index of the genetic profile of cells suitable for periodontal tissue regeneration.

研究分野：再生医療

キーワード：ES細胞 間葉系幹細胞 歯根膜由来間葉系幹細胞 細胞治療 歯周組織再生 神経堤細胞 分化制御 歯周病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の再生医療においては造血系幹細胞や間葉系幹細胞 (MSC) に代表される体性幹細胞の臨床研究が進み、我々の研究室においても自己歯根膜組織由来 MSC (PDL-MSC) を細胞シート状に加工して移植を実施し (Iwata et al., Regenerative Therapy 2018)、10名の患者においてその安全性と有効性を確認している。一方、細胞ソースの問題などで体性幹細胞のみでは完遂出来ない疾患においてはES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞が検討されている。特に本邦においては自己iPS細胞由来網膜色素上皮シートを用いた臨床研究が実施されたものの、遺伝子変異の可能性や症例毎の自己細胞由来iPS細胞樹立と品質管理の困難から、品質の担保された同種iPS細胞とHLAの多様性を加味したiPSストックの設立へと方向転換するに至った。そこで、免疫拒絶が無いとされているMSCを作り出す細胞ソースとしては、遺伝子操作を行っていないES細胞が再注目されている。事実、世界における多能性幹細胞を用いた臨床研究中、ES細胞由来の移植は多数あるものの、iPS細胞移植は国内のみであり、遺伝子操作を行わないES細胞を基軸とした分化誘導法の確立とその安全性担保のための検査技術の適性化が今後必要となる。

一方、歯周組織の再生を行う上で自己PDL-MSCの確保には患者の抜歯が必要であり、上記の先行研究では咬合に参画しない抜去可能歯を保持している患者は少ないことがボトルネックとなった。そこで平成28年度より国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業 (再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)」において「同種歯根膜幹細胞シートの安全性・有効性評価指標の確立と歯周組織の再建」の研究代表者として成人の廃棄智歯よりPDL-MSCの細胞バンクを構築し、その安全性・有効性評価指標を選定した。

2. 研究の目的

歯周組織再生担当細胞である歯根膜細胞は神経堤細胞由来であることが知られているが、その分化制御に関してはほとんど知られていない。そこで本研究ではES/iPS細胞から神経堤細胞を誘導し、神経堤細胞からの歯根膜細胞への分化制御法の解明を実施する。共培養技術やオルガノイド形成法などの様々な技術を導入する。今後の再生医療展開としては安全性・有効性評価を小型動物を用いて実施し、無限に殖えうる新規細胞ソースとしての確立を目指す。

3. 研究の方法

歯根膜組織由来間葉系幹細胞 (PDL-MSC) 特異的遺伝子の探索

PAX9 や LHX8 などすでに確認された遺伝子群以外の PDL-MSC 特異的遺伝子を分担研究者・中井教授と共同で探索する。倫理委員会承認の後に、健康青年より抜去歯牙を採取し、PDL-MSC を採取する。RNA を採取した後に、NGS を用いて全発現解析を実施する。

ES/iPS 細胞を歯根膜細胞に分化させる経路の探索

ES/iPS 細胞を神経堤細胞に分化させた後に歯小嚢細胞を経て、歯根膜細胞への分化誘導技術を開発する。ES 細胞はこれまでに樹立された SEES1~7 を分担研究者・梅澤センター長からの供与を受け、未分化維持での培養手技を確立する。リファレンスとして iPS 細胞を用いる。次に ES 細胞から神経堤細胞 (NCC) への分化誘導 (福田ら Plos One, 2014) を行う。本パートが本研究の最も難易度の高いパートであり PDL-MSC への分化制御がうまく出来ない際には 1) 上皮間葉相互作用を考慮して歯原性上皮細胞との共培養を試みる (新垣ら、JBC 2012)、2) MSX1, BARX1 等の他の遺伝子の導入を試みる、3) PAX9 の発現は FGF8 により誘導されることが知られているので FGF8 を添加する、4) BMP シグナルは FGF8 シグナルを抑制することが知られていることから細胞外アンタゴニストである Noggin を添加する、5) 遺伝子導入や成長因子を使わないケミカルコンパウンドを探索する、等により問題の解明を目指す。

安全性試験ならびに有効性試験の実施

ES 由来 PDL-MSC を通法に従い 1) 1000 万細胞を免疫不全マウスにインジェクション、2) 軟寒天試験、3) 核型解析することで造腫瘍性試験ならびに安全性試験を実施する。また、それと同じくして非臨床での有効性試験を象牙ディスク - PDL-MSC - 骨補填材からなる特殊チャンパーを用いて免疫不全マウス皮下に移植することにより解明する。特殊チャンパーは左図のように、プロトタイプが完成しており、下層 (右部) に直径 6mm の象牙質片 (和光純薬) を設置した後に三層化した PDL-MSC シートを置き、その上に骨補填材顆粒を充填後、上層 (左部) の蓋をする。蓋には 300 μ m の小孔が多数あけられており、血管や体液を通して栄養補給される。材質は PET であり 3D プリンターでの作製が可能であり横にはレーザーにて番号を彫り込むことが出来るので、SCID マウス 1 匹に 10 個程度の移植が可能である。3 週後、12 週後に切片を作製し、セメント質の形成量、PDL スコアリング、靭帯走行の角度測定を行うことにより定量的な評価をするとともに、ペリオスチン、S100A4、ヒトミトコンドリア特異的抗体を用いた免疫染色を実施することにより、移植した細胞の in vivo 分化能を観察し、臨床応用への可能性を検討する。

ES/iPS 細胞から PDL-MSC への分化経路の同定と細胞バンク設立の検討

分化途中段階の全発現解析の結果を経時的にクラスタリングすることにより、特に NCC から PDL-MSC への分化経路とセメント質発生機序の解明を目指す。GO 解析などは共同研究者の中

井教授グループと共同で解析を進め、均質な PDL-MSC 生産システムの構築を目指す。従前までは検体の個体差や培養条件などによりラボによって PDL-MSC の品質には差があったことは否めない。本システムが成功し、かつ無血清培地などを用いることによりどのラボでも再現性のあるセルラインが構築できれば、本領域の更なる発展に貢献できるものと考えられる。また、上記では主に PDL-MSC を前提に計画を立ててきたが、歯髄幹細胞も理論的には同様の戦略で ES/iPS 細胞から分化誘導することが可能であると考えられる。歯髄細胞でも歯周組織を再生することが可能であると報告があることから、これらの歯周組織再生担当細胞の分化誘導技術を追究することにより、歯胚再構築の細胞ソースとしても一助となると考えられる。

4. 研究成果

本研究課題においては歯牙発生における間葉系細胞（具体的には歯小嚢細胞から歯根膜細胞）を ES/iPS 細胞より分化誘導する技術開発を実施し、再生医療における新しい細胞ソースとして利用可能かを検討した。ES/iPS 細胞の神経堤細胞誘導法を用いて、誘導期間の長短や培養方法によって左右される分化効率に着目し、神経堤細胞誘導法をさらなる最適化を実施し、過去の報告と比較してもより高効率と考えられる神経堤細胞誘導法を開発した。現在は、新規神経堤細胞誘導法の実証を行っている。

また、本研究において目指すべきゴールである歯根膜由来間葉系幹細胞に関して、ロット間における性能差が存在することがわかっている。次世代シーケンサーを用いて、ロット間での発現変動遺伝子を解析することで、歯周組織再生療法に用いるにあたっての理想的な間葉系幹細胞の遺伝子発現プロファイルのデータを得た。

増殖因子や低分子化合物、オルガノイド形成法など多角的な手法を用いて、歯根膜由来間葉系幹細胞の分化を試行しており、ES/iPS 細胞由来神経堤細胞の理想的な分化条件の検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Niimi Hiromi, Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Watanabe Kazuki, Hatasa Masahiro, Shimohira Tsuyoshi, Tsuchiya Yosuke, Maekawa Shogo, Hirota Tomomitsu, Kadokura Hiroshi, Yokose Satoshi, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Proliferation and Calcification of Primary Osteoblast-Like Cells Isolated From Rat Calvaria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 459-459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Miho, Katagiri Sayaka, Koyanagi Tatsuhiro, Maekawa Shogo, Shiba Takahiko, Ohsugi Yujin, Takeuchi Yasuo, Ikawa Takahiro, Takeuchi Shogo, Sekiuchi Takayuki, Arai Yuki, Kazama Ryunosuke, Wakabayashi Noriyuki, Izumi Yuichi, Iwata Takanori	4. 巻 47
2. 論文標題 Accuracy of cone beam computed tomography in evaluation of palatal mucosa thickness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 479 ~ 488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Park Joo-Young, Park Chan Ho, Yi TacGhee, Kim Si-na, Iwata Takanori, Yun Jeong-Ho	4. 巻 21
2. 論文標題 rhBMP-2 Pre-Treated Human Periodontal Ligament Stem Cell Sheets Regenerate a Mineralized Layer Mimicking Dental Cementum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3767 ~ 3767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sano Kotaro, Usui Michihiko, Moritani Yuki, Nakazawa Kohji, Hanatani Tomoya, Kondo Hisataka, Nakatomi Mitsushiro, Onizuka Satoru, Iwata Takanori, Sato Tsuyoshi, Togari Akifumi, Ariyoshi Wataru, Nishihara Tatsuji, Nakashima Keisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Co-cultured spheroids of human periodontal ligament mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells enhance periodontal tissue regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 59 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwata Takanori	4. 巻 50
2. 論文標題 PCR detection and new therapies for COVID-19	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science	6. 最初と最後の頁 133 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5051/jpis.2020.50.3.133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onizuka Satoru, Yamazaki Yasuharu, Park Sung-Joon, Sugimoto Takayuki, Sone Yumiko, Sjöqvist Sebastian, Usui Michihiko, Takeda Akira, Nakai Kenta, Nakashima Keisuke, Iwata Takanori	4. 巻 21
2. 論文標題 RNA-sequencing reveals positional memory of multipotent mesenchymal stromal cells from oral and maxillofacial tissue transcriptomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 417-417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-020-06825-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Tomoko, Torii Daisuke, Iwata Takanori, Izumi Yuichi, Nasu Masanori, Tsutsui Takeo W.	4. 巻 33
2. 論文標題 Characterization of proliferation, differentiation potential, and gene expression among clonal cultures of human dental pulp cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 490 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-020-00327-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohsugi Yujin, Niimi Hiromi, Shimohira Tsuyoshi, Hatasa Masahiro, Katagiri Sayaka, Aoki Akira, Iwata Takanori	4. 巻 21
2. 論文標題 In Vitro Cytological Responses against Laser Photobiomodulation for Periodontal Regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9002 ~ 9002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaibuchi Nobuyuki, Iwata Takanori, Onizuka Satoru, Yano Kosei, Tsumanuma Yuka, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Ando Tomohiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Allogeneic multipotent mesenchymal stromal cell sheet transplantation promotes healthy healing of wounds caused by zoledronate and dexamethasone in canine mandibular bones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 77 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onizuka Satoru, Iwata Takanori	4. 巻 20
2. 論文標題 Application of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets for Periodontal Regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2796 ~ 2796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20112796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sjoqvist Sebastian, Kasai Yoshiyuki, Shimura Daisuke, Ishikawa Taichi, Ali Nadiyah, Iwata Takanori, Kanai Nobuo	4. 巻 514
2. 論文標題 Oral keratinocyte-derived exosomes regulate proliferation of fibroblasts and epithelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 706 ~ 712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Park Sung-Joon, Onizuka Satoru, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Iwata Takanori, Nakai Kenta	4. 巻 17
2. 論文標題 A systematic sequencing-based approach for microbial contaminant detection and functional inference	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 72-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-019-0690-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sjoqvist Sebastian, Ishikawa Taichi, Shimura Daisuke, Kasai Yoshiyuki, Imafuku Aya, Bou-Ghannam Sophia, Iwata Takanori, Kanai Nobuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Exosomes derived from clinical-grade oral mucosal epithelial cell sheets promote wound healing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	6. 最初と最後の頁 1565264 ~ 1565264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20013078.2019.1565264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaibuchi Nobuyuki, Iwata Takanori, Onizuka Satoru, Yano Kosei, Tsumanuma Yuka, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Ando Tomohiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Allogeneic multipotent mesenchymal stromal cell sheet transplantation promotes healthy healing of wounds caused by zoledronate and dexamethasone in canine mandibular bones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 77 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwata Takanori, Yamato Masayuki, Washio Kaoru, Yoshida Toshiyuki, Tsumanuma Yuka, Yamada Azusa, Onizuka Satoru, Izumi Yuichi, Ando Tomohiro, Okano Teruo, Ishikawa Isao	4. 巻 9
2. 論文標題 Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets ? A safety and efficacy study in ten patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 38 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moritani Y., Usui M., Sano K., Nakazawa K., Hanatani T., Nakatomi M., Iwata T., Sato T., Ariyoshi W., Nishihara T., Nakashima K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 870 ~ 882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takanori Iwata
2. 発表標題 Periodontal Regeneration with Cell Sheet Technology
3. 学会等名 106th Annual Meeting of American Academy of Periodontology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田隆紀
2. 発表標題 同種歯根膜由来間葉系幹細胞シートによる歯周組織の再生
3. 学会等名 第1回細胞シート工学イノベーションフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwata Takanori
2. 発表標題 Periodontal Regeneration with Periodontal Ligament Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets
3. 学会等名 2018 KAP General Session (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sjoqvist Sebastian JF, ISHIKAWA Taichi, SHIMURA Daisuke, KASAI Yoshiyuki, ONIZUKA Satoru, IMAFUKU Aya, OKADA Ryo, IWATA Takanori, TAKAHASHI Akiko, KANAI Nobuo
2. 発表標題 Regenerative potential of exosomes isolated from clinical grade oral mucosal epithelial cell sheet production
3. 学会等名 5th TERMIS-World Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwata Takanori, Onizuka Satoru, Park Sung-Joon, Tsumanuma Yuka, Nakai Kenta, Izumi Yuichi, Ando Tomohiro
2. 発表標題 The establishment of safety and efficacy evaluation for allogeneic periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cell sheet with next-generation sequencer
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 先進医療フォーラム	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本医学出版	5. 総ページ数 93
3. 書名 再生医療・細胞医療の研究と産業化の最前線	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中井 謙太 (Nakai Kenta) (60217643)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	森田 和機 (Morita Kazuki)		
研究 協力者	王 嘉程 (Wang Jiacheng)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------