

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390546

研究課題名（和文）

ヒト iPS 細胞を用いた歯根再生への画期的アプローチ

研究課題名（英文）

Epoch-making approach for tooth root regeneration using human iPS cells

研究代表者

須田 直人（SUDA NAOTO）

研究者番号：90302885

研究成果の概要（和文）：

DSPP 遺伝子と GAPDH 遺伝子に関し、ヒト配列のみ認識しマウス配列を認識しない TaqMan プローブを設計した。ヒト iPS 細胞分化のため、様々な feeder 細胞を用いて DSPP 遺伝子の発現誘導を検討した。計 6 種の feeder 細胞を検討し、マウス胎児線維芽細胞が最も効率良くヒト iPS 細胞の DSPP 発現を誘導した。分化誘導因子として、10 種以上の成長因子やサイトカインを検討し、TGF- β が最も効率良く DSPP 発現を誘導した。歯根の三次元構造解析を DICOM データにより詳細に解析する評価系を確立した。

研究成果の概要（英文）：

The human specific TaqMan probes for DSPP and GAPDH which were not recognized by mouse sequences were designed. To test the appropriate feeder cells for the differentiation of iPS cells to DSPP expressing cells, mouse embryonic fibroblasts were found to be most potent. More than 10 growth factors and cytokines were tested for the differentiation, and TGF- β was the most effective molecule. An analyzing system for the three-dimensional tooth root structure using DICOM data was also established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：iPS 細胞、歯根、組織再生、3 次元構築

1. 研究開始当初の背景

様々な技術革新を背景にして、歯科治療により咬合、歯列、咀嚼といった口腔機能や審

美性の回復が可能となっている。反面、歯科治療により、口腔の形態や機能の維持の上でマイナスとなる歯根吸収が誘発されること

も実情である。このような例では、歯科治療そのものが組織破壊を誘発しているとも言え、その対策はきわめて急務で重要な課題である。

我々は、歯根吸収の抑制を目的として、エナメルタンパクの1つのアメロゲニンを実験動物の歯根表面に塗布した。興味深いことにアメロゲニンは、上顎臼歯再植に伴う歯根吸収において、odontoclast 数と歯根吸収面積を著しく減少させた。

一方、矯正治療に伴う歯根吸収を対象とした場合、既に顕著な吸収が進行した後に発見される例が多く、現実的なアプローチとして歯根吸収抑制よりも歯根再生が重要となる。そこで研究代表者は、ヒト歯根表面から cementoblast を単離し、不活化後、ヒト羊膜を用いた細胞移入により、実験動物の局所にセメント質形成を誘導を検討している。このような細胞生物学的アプローチによって、歯根再生を実現させ、近い将来に歯根吸収を伴わない矯正治療を安心して提供できることを期待している。

しかしながら、臨床応用を考えた場合、上記のような単離 cementoblast を用いた歯根再生は、拒絶反応の回避のため、歯根吸収が惹起された患者本人から歯を抜歯し cementoblast を単離しなければならないという大きな制約がある。最近、ES (embryonic stem) 細胞に変わる有力な多分化能を持つ細胞として、ヒト iPS (induced pluripotent stem) 細胞が注目を受けている。

2. 研究の目的

細胞生物学的アプローチによって歯根再生を現実のものとするためには、歯根吸収が惹起された患者本人から歯を抜歯後 cementoblast を単離し、拒絶反応を回避しなければならない。

本研究課題の目的は、上記の大きな制約を克服すべくヒト iPS 細胞の多分化能を利用して cementoblast の単離に必要な抜歯を回避し、歯根再生を実現させることである。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、様々なフィーダー細胞上でヒト iPS 細胞を培養し、安定した分化誘導が行える条件を検討する。具体的には、歯原性間葉細胞のマーカー遺伝子である DSPP の発現を検討する計画である。効率良く DSPP 発現が誘導可能な培養条件や培養環境を確立する。

(2) また将来的な歯根再生を念頭に置いた際には、歯根とその支持組織である歯槽骨との相互関係を臨床的に解析することが重要となる。そこで、CT の DICOM データを用いた解析を行い、来るべき歯根再生に向けて理想的な 歯根-歯槽骨 の臨床像を検討する。

4. 研究成果

(1) DSPP 遺伝子と house keeping gene である GAPDH 遺伝子に関して、ヒト配列のみ認識しマウス配列を認識しない TaqMan プローブを設計した。このような種特異的なプローブは、ヒト iPS 細胞の feeder 細胞としてヒト以外の細胞を用いる制約から必要とされた。

(2) 効率的分化誘導が可能になる種々の条件整備に注目して研究を遂行した。ヒト iPS 細胞の維持のため、様々な feeder 細胞を用いて DSPP 遺伝子の発現誘導を検討した。計 6 種の feeder 細胞を検討した結果、DSPP 遺伝子の発現に関しては、マウス胎児線維芽細胞が、最も効率良くヒト iPS 細胞を分化誘導させることが明らかとなった。

(3) さらに分化誘導因子として、10 種以上の種々の成長因子やサイトカインの作用を検

討した。その結果、マウス胎児線維芽細胞上でTGF-βが最も効率良くDSPP遺伝子を発現誘導することを明らかにした。

(4) 上記に加えて、歯根の三次元構造解析をDICOM データにより詳細に解析するための評価系を構築し、実験動物や患者資料を用いた歯根の形成や再生の解析が簡便に行えるようになった。

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 20 件)

- ①Saito M, Kurokawa M, Oda M, Oshima M, Tsutsui K, Kosaka K, Nakao K, Ogawa M, Manabe RI, Suda N, Ganjargal G, Hada Y, Noguchi T, Teranaka T, Sekiguchi K, Yoneda T, Tsuji T. ADAMTSL6β rescues fibrillin-1 microfibril disorder in Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. J Biol Chem 査読有, 286: 38602-13, 2011. 10.1002/jcp.24021
- ②Suzuki H, Suda N, Shiga M, Kobayashi Y, Nakamura M, Iseki S, Moriyama K. Apert syndrome mutant FGFR2 and its soluble form reciprocally alter osteogenesis of primary calvarial osteoblasts. J Cell Physiol 査読有 2012, 印刷中. 10.1002/jcp.24021
- ③Okamura E, Suda N, Baba Y, Fukuoka H, Ogawa T, Ohkuma M, Ahiko N, Yasue A, Tengan T, Shiga M, Tsuji M, Moriyama K. Dental and maxillofacial characteristics in six Japanese individuals with ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting (EEC) syndrome. Cleft Palate Craniofac J. 査読有 2012, 印刷中. 10.1597/11-123
- ④根岸亜矢子, 田島ルミ子, 川島成人, 権田秋華, 真野樹子, 駒沢大悟, 須田直人. 習

慣性いびき症を有する片側性唇顎口蓋裂児の顎顔面形態と気道形態: 第 2 報 習慣性いびき症を有する非裂児との比較. Orthod Waves 査読有 71, 14-23, 2012

⑤権田秋華, 川島成人, 根岸亜矢子, 真野樹子, 駒沢大悟, 須田直人. 習慣性いびき症の片側性唇顎口蓋裂児に関する Ricketts 分析の評価: 顎顔面形態と気道形態の関連性 Orthod Waves 査読有 71, 24-32, 2012.

⑥須田直人. 知らずに診ている先天性疾患. 埼玉歯大より, 査読無, 546, 27-31, 2012.

⑦Honda MJ, Suda N, Moriyama K. A new function of Amelogenin. -From Bench to Clinics, and Clinics to bench-. Journal of Oral Biosciences, 査読有, 53:241-247, 2011.

⑧須田直人. まだ歯がない赤ちゃんの矯正治療. 埼玉歯大より, 査読無, 545, 42-45, 2011.

⑨Suda N. Tooth and bone research using genetically modified mice. Clin Calcium. , 査読無, 22, 2012, 27-31.

⑩Suda N, Ogawa T, Kojima T, Saito C, Moriyama K. Familial Non-syndromic Oligodontia with a Novel Frame Shift Mutation of PAX9 is Related to Impaired RNA Stability. J Dent Res, 査読有, 90, 382-6, 2011. 10.1177/0022034510390042

⑪Sasaki A, Yamada T, Inoue K, Momoi T, Tokunaga H, Sakiyama K, Kanegae H, Suda N, Amano O. Localization of heat shock protein 27 (hsp27) in the rat gingiva and its changes with tooth eruption. Acta Histochem Cytochem 査読有, 44, 17-24, 2011. 10.1267/ahc.10033

⑫Ganburged G, Suda N, Saito M, Yamazaki Y, Isokawa K, Moriyama K. Dilated capillaries, disorganized collagen fibers and differential gene expression in periodontal ligaments of

hypomorphic fibrillin-1 mice. Cell Tissue Res, 査読有,341,381-95,2010. 10.1007/s00441-010-1021-5

⑬ Kawafuji A, Suda N, Suzuki T, Ichikawa N, Kakara S, Baba Y, Ogawa T, Tsuji M, Moriyama K. Systemic and maxillofacial characteristics of individuals affected by Beckwith-Wiedemann syndrome who have not received a glossectomy. Am J Orthod Dentofacial Orthop 査読有, 139: 517-25, 2011. 10.1016/j.ajodo.2009.07.021

⑭ Suda N, Hattori M, Kosaki K, Banshodani A, Kozai K, Tanimoto K, Moriyama K. Correlation between genotype and supernumerary tooth formation in cleidocranial dysplasia. Orthod Craniofac Res, 査読有, 13, 197-202, 2010.

⑮ Suda N, Bazar A, Bold O, Jigid B, Gardkhuu, A, Ganburged G, Moriyama K. A Mongolian patient with hypohidrotic ectodermal dysplasia with a novel P121S variant in EDARADD. Orthod Craniofac Res, 査読有, 13, 114-117, 2010. 10.1111/j.1601-6343.2010.01484.x

⑯ Suda N, Kawafuji K; Moriyama K. Multidisciplinary management including endodontics, periodontics, orthodontics, anterior maxillary osteotomy and prosthetics in an adult case with a severe openbite. Orthod Waves, 査読有, 68, 42-49, 2009

⑰ Hattori M, Torii C, Yagihashi T, Izumi K, Suda N, Ohyama K, Takahashi T, Moriyama K, Kosaki K. Diagnosis of Russell-Silver syndrome by the combined bisulfate restriction analysis –denaturing high performance liquid chromatography assay. Genet Test Mol Biomarkers, 査読有, 13,623-30,2009.

⑱ Yagi Y, Suda N, Yamakoshi Y, Baba O, Moriyama K. In vivo application of amelogenin

suppresses root resorption. J Dent Res, 査読有, 88,176-81, 2009. 10.1177/0022034508329451

⑲ Suda N, Moriyama K. Human diseases accompanied with abnormal tooth roots. Journal of Oral Bioscience, 査読有, 51,199-204,2009.

⑳ Suda N, Shiga M, Ganburged G, Moriyama K. Marfan syndrome and its disorder in periodontal tissues. J Exp Zoology, 査読有,312B,1-7,2009. 10.1002/jez.b.21278

[学会発表] (計 20 件)

① 駒澤大悟, 松井成幸, 神原学, 櫻井洋介, 大塚雄一郎, 梅崎栄作, 須田直人. 歯の移動時において歯槽骨の高さの違いが与える上顎中切歯の変位様相への影響—3次元有限要素法による変位解析を用いて—. 日本機械学会関東支部第18期総会講演会. 3月9-10日, 千葉.

② 富塚慶徳, 梅崎栄作, 松井成幸, 駒澤大悟, 須田直人. 歯科矯正における矯正ワイヤー断面形状の歯移動への影響. 日本機械学会関東支部第18期総会講演会. 3月9-10日, 千葉.

③ 藤田昌樹, 吉川紀之, 平池正人, 永山英恵, 三上早奈英, 西野広人, 江川里沙, 吉川正芳, 打矢五月, 森一将, 嶋田淳, 須田直人. 顔面非対称を伴う線維性骨異形成症の1例. 第70回東京矯正歯科学会. 平成23年7月20-21日, 東京.

④ 須田直人, Ganburged G. Marfan 症候群のモデルマウスに誘発した歯周疾患に対する Angiotensin II receptor blocker (Telmisartan) の薬理効果. 第8回エラスチン研究会学術集会.2010年12月3-4日. 東京.

⑤ Ganburged G, 須田直人, 森山啓司. マルフアン症候群の歯周疾患モデルにおける

Angiotensin II receptor blocker (Telmisartan) の薬理効果. 第 69 回日本矯正歯科学会. 2010 年 9 月 27-29 日, 横浜.

⑥鈴木尋之, 須田直人, 志賀百年, 谷本幸穂, 中村正孝, 井関祥子, 森山啓司. Apert 症候群型の変異 FGFR2 (S252W) とその可溶性変異体を過剰発現するトランスジェニックマウスの細胞生物学的解析. 第 69 回日本矯正歯科学会. 2010 年 9 月 27-29 日, 横浜.

⑦三上智彦, 森田淳平, 大隈瑞恵, 小川卓也, 辻美千子, 須田直人, 森山啓司. 当分野を受診した Down 症候群患者に対する矯正歯科的アプローチ. 第 69 回日本矯正歯科学会. 2010 年 9 月 27-29 日, 横浜.

⑧大宅彩, 保田裕子, 渡辺千穂, 大隈瑞恵, 小川卓也, 辻美千子, 須田直人, 森山啓司. 当分野を受診した Down 症候群患者の歯科臨床的特徴について - 永久歯の異常に関する検討-. 第 69 回日本矯正歯科学会. 2010 年 9 月 27-29 日, 横浜.

⑨池田倫世, 伊藤洋介, 大隈瑞恵, 小川卓也, 辻美千子, 須田直人, 森山啓司. 当分野を受診した Down 症候群患者の歯科臨床的特徴について - 頭蓋顎顔面形態に関する検討-, 第 69 回日本矯正歯科学会. 2010 年 9 月 27-29 日, 横浜.

⑩須田直人, 小川卓也, 小島拓, 齊藤力, 森山啓司. PAX9 遺伝子に新規フレームシフト型変異を有する先天性多数歯欠損家系の解析. 第 52 回日本歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 20-22 日, 東京.

⑪Suda N, Ganburged G, Saito M, Yamazaki Y, Isokawa K, Moriyama K. Fibrillin-1 is indispensable for normal collagen fiber architecture and gene expression in periodontal ligament. 10th Tooth morphogenesis and differentiation, Sep1-4, 2010, Berlin, Germany.

⑫Suzuki H, Suda N, Shiga M, Nakamura M,

Iseki S, Moriyama K. Osteoblastic differentiation of transgenic mice overexpressing Apert syndrome-type mutant FGFR2 and its soluble form. 10th Tooth morphogenesis and differentiation, Sep1-4, 2010, Berlin, Germany.

⑬阿彦希, 須田直人, 辻美千子, 小川卓也, 大隈瑞恵, 福岡裕樹, 岡村絵里花, 鈴木一史, 馬場祥行, 森山啓司. EEC 症候群患者における全身および顎顔面・口腔領域の異常に関する検討. 第 34 回口蓋裂学会. 2010 年 5 月 27-28 日, 東京.

⑭Ganburged G, Suda N, Saito M, Yamazaki Y, Isokawa K, Moriyama K. Microfibril is essential for normal development of periodontal ligaments (PDLs). 88th General session of International Association for Dental Research. July 14-17, 2010, Barcelona, Spain.

⑮須田直人, 富永直子, 新中康史, 天笠光雄, 森山啓司. 下顎臼歯部歯槽骨切り術後に LeFort I 型骨切り術と下顎枝矢状分割術を施行した下顎狭窄歯列を伴う顔面非対称症例. 第 20 回日本顎変形症学会総会. 2010 年 6 月 15-16 日, 札幌.

⑯齊藤正寛, 須田直人, Ganburged G, 辻孝. 新規細胞外マトリックスである ADAMTSL-5 は歯根膜のマイクロフィブリル形成を促進する. 第 7 回エラスチン研究会学術集会. 2009 年 12 月 4-5 日. 北九州市.

⑰須田直人, 志賀百年, Ganburged G, 齊藤正寛, 山崎洋介, 磯川桂太郎, 森山啓司. 歯根膜に局在する弾性線維の機能解析に関するアプローチ. 第 7 回エラスチン研究会学術集会, 2009 年 12 月 4-5 日, .北九州市.

⑱Ganburged G, Suda N, Saito M, Yamazaki Y, Isokawa K, Moriyama K. Differential gene expression in periodontal ligament of mouse model of Marfan syndrome. 第 74 回口腔病学

会学術大会 2009 年 12 月 4-5 日, 東京.

⑱服部架, 鳥居千春, 須田直人, 小崎健次郎, 森山啓司.COBRA-DHPLC 法によるラッセルシルバー症候群の遺伝子診断システムの開発. 第 68 回日本矯正歯科学会. 2009 年 11 月 16-18 日, 福岡.

⑳中澤祐紀, 須田直人, 森山啓司. 先天性多数歯欠損症患者における永久歯の形成異常に関する報告. 第 68 回日本矯正歯科学会. 2009 年 11 月 16-18 日, 福岡.

[図書] (計 1 件)

①須田直人. 医師・歯科医師のための口腔診療必携—困ったときのマニュアル・ヒント集—, (高戸毅. 監修), 59 頁, 金原出版, 2010, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 直人 (SUDA NAOTO)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号 : 90302885

(2) 研究分担者

井関 祥子 (ISEKI SACHIKO)
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 : 80251544

太田 正人 (OHTA MASATO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号 : 70313228

松井 成幸 (MATSUI SHIGEYUKI)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 40190392

吉川 正芳 (YOSHIKAWA MASAYOSHI)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号 : 80200963

真野 樹子 (MANO MIKIKO)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号 : 00333005

櫻井 洋介 (SAKURAI YOUSUKE)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号 : 20529630

佐々木 会 (SASAKI AU)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号 : 60580230

神原 学 (KOUHARA MANABU)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号 : 40602529