

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 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究年度：2010～2012

課題番号：22592174

研究課題名（和文）iPS細胞を用いた顎骨再生の臨床基盤技術の開発

研究課題名（英文）Establishment of cell therapy in maxillary and mandibular bone tissue regeneration using canine induced pluripotent stem cells

研究代表者

橋本典也（HASHIMOTO YOSHIYA）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20228430

研究成果の概要（和文）：イヌの線維芽細胞にイヌ OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子を導入し、iPS 細胞を作製した。p75、HNK-1 の表面抗原を指標としてセルソーターにて神経堤細胞を分離した。分離後の細胞は免疫染色にて評価した。さらに同細胞を骨芽細胞誘導培地で 14 日間培養した。免疫染色の結果、イヌ iPS 細胞より神経堤細胞への誘導が確認された。さらに、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められたことから骨芽細胞様細胞に分化している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We reported the generation of canine induced pluripotent stem cells by the transcription factors Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc into canine embryonic fibroblasts (CEFs). Canine iPS cells were cultured on MEFs under knockout serum replacement and neural stem cell serum free medium. Then, flow cytometry was performed on neural-like cells derived from canine iPS cells to sort for p75 and HNK1. Isolated neural crest (NC) cells were cultured in neural stem cell serum free medium containing osteoblast differentiation factor. NC cells isolated from neural-like cell were observed for differentiation based on p75 and HNK1 staining. ALP activity of NC cells was increased in the osteoblast-induction for 14 days, thus, NC cells might be differentiated to osteoblast-like cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：顎顔面補綴、iPS 細胞、顎骨再生

1. 研究開始当初の背景

再生医療は喪失した臓器や組織を新たに作り出し機能させるものであり、歯周組織再生技術の確立は将来の新しい歯周疾患の治療法として期待されている。再生医療においては再生組織をあらかじめ工業的に大量生産して、必要時にいつでも利用可能にするに

は、培養系を用いた in vitro 組織再生が望ましい。

In vitro において特定の組織タイプの再生が可能となれば、歯周疾患の治療法に変革がもたらされるかもしれない。勿論、歯周組織再生に対して最適な幹細胞ソースに関しては、多くの解明すべき問題点が残されてい

るが、組織再生を目指した研究において、幹細胞は鍵を握ると考えられる。

人間の皮膚などの体細胞に、極少数の遺伝子を導入し、数週間培養することによって、様々な組織や臓器の細胞に分化する能力とほぼ無限に増殖する能力をもつ多能性幹細胞に変化する。山中らはこの細胞を世界で初めて作製に成功し人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) と名付けた。体細胞が多能性幹細胞に変わることがリプログラミングである。わずか4つの遺伝子の操作でリプログラミングを起こさせる山中らの技術は、再現性が高く、また比較的容易であり、幹細胞研究において画期的なものである。したがって、患者の体細胞から iPS 細胞を作り、それを歯周組織の細胞に分化させ細胞移植によって歯周組織治療を行なうことも理論的には可能となった。

しかし、今のところ iPS 細胞から直接、歯周組織の細胞に分化させる方法は確立していない。そこで、神経提細胞を経由して骨芽細胞様細胞へと分化誘導することに着目した。神経提細胞は神経板が陥入し、神経管を形成する過程で、神経管愈合部より発生する細胞集団であり、その特異性から第四の胚葉とも呼ばれている。神経提細胞は神経管から離れるとすみやかに末梢に移動し、脊髄神経節、知覚神経、副腎髄質、色素細胞などに分化する。また、頭蓋顔面の硬組織の 90%以上は頭部神経提細胞に由来すると考えられているため、そのような面からも iPS 細胞からそれらの細胞を分化誘導すればより効率的に骨芽細胞様細胞が得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

iPS 細胞の臨床応用には、長期間の観察によって、生体内での機能維持やがん細胞にならないことなどを確認することが欠かせない。特にビーグル犬は 10 年以上生きるため、再生骨組織の有効性や安全性を確かめるには、イヌを用いた臨床モデルは有用である。すなわち、イヌでの細胞移植研究を通じ、その *in vivo* での機能性を解析し、喪失した歯周組織の再生治療の基盤を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) イヌ iPS 細胞の作製

ヒト iPS 細胞の作製法をイヌに応用するために部分的に改変、改良を行った。レトロウイルスベクターにイヌ OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子をそれぞれクローニングした発現ベクターを作製した。イヌの胎児の皮膚組織から酵素法により線維芽細胞を単離した。レトロウイルスの作製のためパッケージング細胞として PLAT-GP 細胞を用い、上記それ

ぞれの遺伝子を導入した。そしてイヌの線維芽細胞にレトロウイルスと化学阻害剤を加え、感染 7 日後に、マウス胎児線維芽細胞をフィーダー細胞として再播種した。

(2) イヌ神経提細胞への誘導

21 日後に単離できたコロニーを回収した。コロニーをフィーダー細胞に播種しコンフレントになった iPS 細胞を ES 培養用 D-MEM 培養液に KnockOut Serum Replacement を加えた無血清培地 (KSR) ならびに無血清ヒト神経幹細胞培養培地 (NSC) に SB-431542 と Noggin の 2 種類の添加剤を加えた培養液で 19 日間培養した。p75、HNK-1 の表面抗原を指標としてファックスセルソーターにて神経幹細胞様細胞をソーティングした。

細胞は p75、HNK-1 の蛍光免疫染色にて評価した。

(3) イヌ骨芽細胞様細胞への誘導

神経提細胞をアスコルビン酸、デキサメタゾン、 β グリセロリン酸ナトリウムを含む骨芽細胞誘導培地で 7、14 日間培養した。細胞を破碎した抽出物より ELISA 法によってアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定した。

4. 研究成果

イヌ OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子を

導入した線維芽細胞は 21 日後に iPS 細胞に特徴的な形態を示した (図 1)。さらに、SB-431542 と Noggin を含む無血清培養下でイヌ iPS 細胞を 2 週間培養したところ神経幹細胞様細胞の形態に変化した (図 2)。ファックスセルソーターによって分離された神経提細胞の代表的なイメージを図 3 に示す。p75、HNK-1 の表面抗原を指標としてセルソーティングを行なったところ両抗体に陽性であった細胞は 1% であった。得られた神経提細胞の p75、HNK-1 の免疫染色を行なったところ発現が認められた。

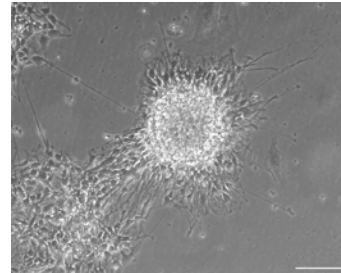


図 1. イヌ胎児繊維芽細胞から誘導したイヌ iPS 細胞 (Bar:100 μ m)

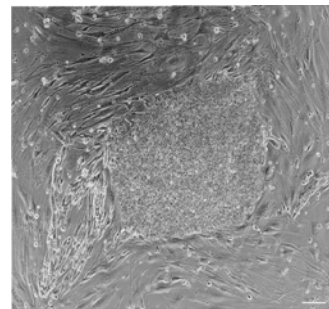


図 2. イヌ iPS 細胞から誘導したイヌ神経幹細胞様細胞 (Bar:100 μ m)

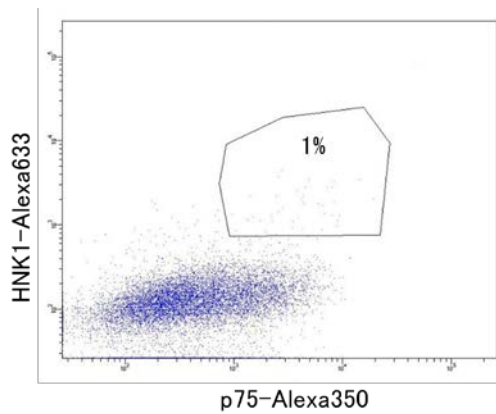


図 3.ファックスセルソーターで分離したイヌ神経提細胞

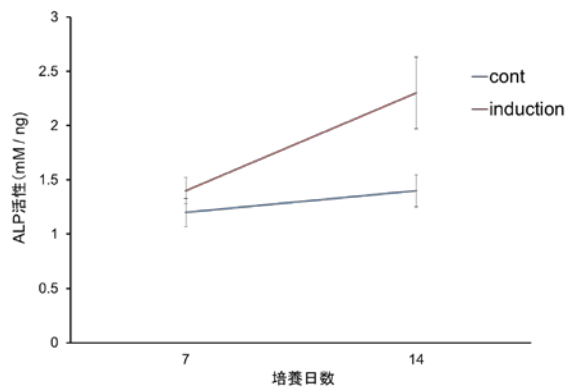


図 4. イヌ骨芽細胞様細胞の ALP 活性

非誘導群と誘導群の ALP 活性を図 4 に示す。骨芽細胞分化培地にて培養を行なったところ誘導群で非誘導群に比較して有意に ALP 活性の上昇が認められた。

PS 細胞移植による歯周組織再生の研究も始まっている。Duan ら¹⁾はハイドロキシアパタイトコーティングした silk fibroin スキャフォールドに iPS 細胞を播種し、マウス骨欠損部に移植したところ歯槽骨や歯根膜組織の再生が促進したことを報告した。我々も作製した神経提細胞から分化させた骨芽細胞様細胞をアパタイト/コラーゲン複合スポンジに播種し、イヌの下顎骨欠損モデルに移植する実験計画を立案している。実験では、分化誘導とセルソーティングによって iPS 細胞の多能性による奇形種形成を回避しているが、長期間の観察によって、がん細胞にならないことなどを確認することが欠かせない。中型動物を使用した本モデル研究が iPS 細胞を使用した細胞移植治療開発の一助となることを期待する。iPS 細胞による細胞移植治療が歯周組織の再生を促進すれば、従来の歯周疾患治療に新たなオプションを提供することになり本研究は大きな意義がある。

1) Duan, X., Tu, Q., Zhang, J., Ye, J., Sommer, C. et al.: Application of induced

pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration: J Cell Physiol, 2011 226, 150-157.

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 11 件)

- ① Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Ando K, Omasa T, Kotani J. Dedifferentiated fat cells differentiate into osteoblasts in titanium fiber mesh. Cytotechnology 2013; 65: 15-22. 査読有
- ② Arima Y, Uemura N, Hashimoto Y, Baba S, Matsumoto N. Evaluation of bone regeneration by porous alpha-tricalcium phosphate/atelocollagen sponge composite in rat calvarial defects. Orthodont Waves 2013;72(1),23-29,. 査読有
- ③ Omata K, Matsuno T, Asano K, Hashimoto Y, Tabata Y, Satoh T. Enhanced bone regeneration by gelatin-b-tricalcium phosphate composites enabling controlled release of bFGF. J Tissue Eng Regen Med 2012:DOI:10.1002/term.1533. 査読有
- ④ 橋本典也, 島田英徳, 中田顕, 茂野啓示, 松野智宣, 佐藤田鶴子, 中村達雄, 武田昭二. イヌ iPS 細胞を用いた歯周組織再生における細胞治療の基盤確立. 日本歯科医学会誌 2012; 31: 29-33. 査読有
- ⑤ Yasui K, Hashimoto Y, Hontsu S, Baba S, Matumoto N. Evaluation of Bone Regeneration of Apatite Coating Poly-L-lactide Scaffold in Rat Calvarial Defects. Nano Biomed 2012; 4: 133-142. 査読有
- ⑥ Shimada H, Hashimoto Y, Nakada A, Shigeno K, Nakamura T. Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia. Biochem Biophys Res Commun 2012; 417: 659-664. 査読有
- ⑦ Sakai K, Hashimoto Y, Baba S, Nishihara A, Matsumoto N. Effects on bone regeneration when collagen model polypeptides are combined with various sizes of alpha-tricalcium phosphate particles. Dent Mater J 2011; 30: 913-922. 査読有

- ⑧ Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Omasa T, Kotani J. Self-assembling peptide RADA16 as a scaffold in bone tissue engineering using dedifferentiated fat cells. J Oral Tissue Engin 2011; 8: 151-161. 査読有
- ⑨ Baba S, Hshimoto Y, Inoue T, Kimura D, Sumikura S, Sonoda Y, Yamada Y, Ito K, Hojo M, Adachi T. Evaluation of a 3-D, woven-fabric, composite scaffold using experimental canine models of bone defects in mandibles. J Oral Tissue Engin 2011; 8: 212-221. 査読有
- ⑩ Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y, Shigeno K, Shionoya Y, Nakamura T. Generation of canine-induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. Mol Reprod Dev 2010; 77: 2. 査読有
- ⑪ Baba S, Inoue T, Hashimoto Y, Kimura D, Ueda M, Sakai K, Matsumoto N, Hiwa C, Adachi T, Hojo M. Effectiveness of scaffolds with pre-seeded mesenchymal stem cells in bone regeneration - Assessment of osteogenic ability of scaffolds implanted under the periosteum of the cranial bone of rats. Dent Mater J 2010; 29: 673-681. 査読有
- [学会発表] (計 16 件)
- ① 岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 安東 佳代子, 大政 健史, 小谷 順一郎. 脱分化脂肪細胞を用いた顎骨再生におけるトランスレーショナル研究. 第 29 回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」2013. 1. 12 東京
- ② Hashimoto Y, Yasui K, Arima Y, Baba S, Matsumoto N. Fabrication of calcium phosphate coating poly-L-lactide scaffold using pulsed laser deposition. 10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery Bali - Indonesia 2012 2012. 11. 17 バリ、インドネシア.
- ③ 橋本 典也, 島田 英徳*, 中田 顕, 茂野 啓示, 中村 達雄, 武田 昭二. iPS 細胞を用いた顎骨再生の基礎的研究. 第 22 回日本歯科医学会総会 2012. 11. 9 大阪市.
- ④ 廖 文, 岡田 正弘, 居波 薫, 橋本 典也, 松本 尚之. ポーラスポリ-L-乳酸足場材料を用いた in vitro ヒト歯根膜様組織の作製. 第 10 回日本再生歯科医学会 2012. 9. 2 神戸市.
- ⑤ 岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 安東 佳代子, 坂本 章人, 大政 健史, 小谷 順一郎. ヒト脱分化脂肪細胞は脂肪幹細胞より骨芽細胞分化能が高い. 第 10 回日本再生歯科医学会学術大会・総会 2012. 9. 2 神戸.
- ⑥ Yasui K, Arima Y, Hontsu S, Hashimoto Y, Baba S, Matsumoto N. Evaluation of bone regeneration of poly-L-lactide scaffold coating thin calcium phosphate by 3D image construction. 100th FDI Annual World Dental Congress 2012. 8. 29 Hong Kong, China.
- ⑦ 橋本 典也, 島田 英徳, 中田 顕, 茂野 啓示, 中村 達雄, 武田 昭二. イヌ iPS 細胞から骨芽細胞様細胞の誘導. 第 9 回日本再生歯科医学会大会・総会 2011. 9. 10 大阪市
- ⑧ 岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 安東 佳代子, 坂本 章人, 大政 健史, 小谷 順一郎. 脱分化脂肪細胞は Titanium Web スキャフォールド内で骨芽細胞へ分化する. 第 9 回日本再生歯科医学会大会・総会 2011. 9. 10 大阪市
- ⑨ 有馬 良幸, 安井 憲一郎, 坂井 加奈, 坂本 章人, 橋本 典也, 馬場 俊輔, 松本 尚之. コラーゲン様ポリペプチド/トリリン酸カルシウム骨補填材の骨形成能のマイクロフォーカス X 線 CT による評価. 第 9 回日本再生歯科医学会大会・総会 2011. 9. 10 大阪市
- ⑩ Hashimoto Y, Kishimoto N, Momota Y, Kotani J, Omasa T, Takeda S. Scaffolds and dedifferentiated fat cells for bone tissue engineering. International dental materials Congress 2011. 2011. 5. 28 ソウル、韓国
- ⑪ Sakai K, Hashimoto Y, Baba S, Nishiura A, Matsumoto N. Effects on bone regeneration when collagen model polypeptides are combined with various sizes of alpha-ticalcium phosphate particles. International dental materials Congress 2011. 2011. 5. 28 ソウル、韓国
- ⑫ HASHIMOTO Y, SHIMADA H, NAKATA K, SHIGENO K, NAKAMURA T, TAKEDA S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Canine Adipose-derived Stromal Cells. The 89th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research 2011. 3. 17 サンディエゴ、USA
- ⑬ 岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 大政 健史, 小谷 順一郎. 脱分化脂肪細胞と自己組織化ペプチド RADA16 再生

医療. 第 10 回日本再生医療学会
2011.2.28 東京

⑭ 島田英徳, 橋本典也, 中田 顕, 茂野
啓示, 小林丈士, 中村達雄. イヌ iPS 細胞
から神経堤細胞への分化誘導再生医療.
第 10 回日本再生医療学会
2011.2.28 東京

⑮ 岸本直隆, 百田義弘, 橋本典也, 大政
健史, 小谷 順一郎. 脱分化脂肪細胞
を用いた骨組織工学における自己組織
化ペプチド RADO16 の足場材料としての
有用性. 第 8 回日本再生歯科医学会
2010.10.30 名古屋

⑯ 橋本典也, 島田英徳, 中田 顕, 茂野
啓示, 中村達雄, 武田昭二, 成犬脂肪由
来間質細胞からの iPS 細胞の誘導. 第 8
回日本再生歯科医学会 2010.10.30 名
古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 典也 (HASHIMOTO YOSHIYA)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 20228430

(2) 研究分担者

松野 智宣 (MATSUNO TOMONORI)
日本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 80199827

武田 昭二 (TAKEDA SHOJI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20067185

(3) 連携研究者

中村 達雄 (NAKAMURA TATSUO)
京都大学・再生医科学研究所・准教授
研究者番号: 70227908