

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3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659372

研究課題名（和文）iPS細胞を用いた歯の再生に向けた基盤技術の開発

研究課題名（英文）Development of basic technology for tooth regeneration using iPS cells.

研究代表者

山本 照子 (TERUKO TAKANO-YAMAMOTO)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00127250

研究成果の概要（和文）：我々は iPS 細胞を用いた人工歯胚の作製を着想し、実現に向けた基盤的研究を行ってきた。まずヒトの歯髄細胞由来のエピソーマル iPS 細胞を樹立した。RT-PCR と免疫染色による幹細胞マーカーの発現解析と、アルカリフォスファターゼ活性の解析の結果、得られた細胞は幹細胞の形質を有することが示唆された。さらに核型解析を行った結果、染色体異常が認められないことを確認した。今後、樹立した iPS 細胞から分化した間葉細胞と上皮細胞を3次的に再構築し、人工歯胚の作製を目指す。

研究成果の概要（英文）：We planned to generate bioengineered tooth using iPS cells, and have performed fundamental research for it. We established iPS cells derived from human dental pulp cells and, analyzed stem cell marker expression. The results suggest that our iPS cells have features of stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 330,000 | 3,230,000 |

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：再生医療、ヒト iPS 細胞、ヒト歯髄細胞、

1. 研究開始当初の背景

歯の先天欠如や、齲蝕および歯周炎に起因した歯の喪失などによる歯の欠損の治療は、現在人工材料を用いた補綴処置が主である。しかし活発な研究の成果により、歯の再生医療が現実味を帯びてきた。近年、多能性を有する iPS 細胞が作製され、再生医療への応用が期待されている。そこで我々は、iPS 細胞を用いた人工歯胚の作製を着想し、実現に向

けた基盤的技術の開発を行うこととした。

2. 研究の目的

歯および口腔組織に由来する細胞から iPS 細胞を樹立し、HES1 遺伝子を調節して間葉細胞を誘導する方法を応用して歯胚への誘導能を有する細胞を作製する。さらに、iPS 細胞から樹立した歯胚への誘導能を有する間葉細胞と口腔粘膜上皮細胞を再構築して人工歯胚を作製する技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄細胞培養

矯正歯科治療のために抜歯した、永久歯から歯髄組織を採取した。歯髄組織をメスで細かく刻み、dispase と collagenase で処理をした後、培養ディッシュに播種した。歯髄細胞を増殖させ、サブコンフルエントに達した時点で継代を行った。

(2) ヒト歯髄細胞由来 iPS 細胞の樹立

第三継代のヒト歯髄細胞に、京都大学 iPS 研究所でサブクローニングされたエピソーマルプラスミド pCXLE-hOCT3/4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL をエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。遺伝子導入後6日目に SNL フィーダー細胞上にそれぞれの細胞を播種し、ヒト iPS 細胞用培地にて培養した。

(3) ヒト歯髄細胞由来 iPS 細胞の characterization

樹立したヒト歯髄細胞由来 iPS 細胞における未分化細胞マーカーの発現を解析するために RT-PCR と免疫染色を行った。またアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を行った。さらに染色体異常の有無を検討するために、核型解析を行なった。

4. 研究成果

(1) ヒト歯髄細胞培養

第二継代のヒト歯髄細胞を図1に示す。紡錘形を呈し、線維芽細胞様の形態を示した。

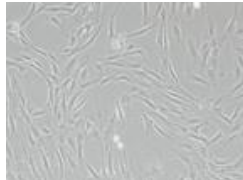


図1. ヒト歯髄細胞の位相差顕微鏡像

(2) ヒト歯髄細胞由来 iPS 細胞の樹立

樹立したヒト iPS 細胞のコロニーを図2に示す。辺縁が明瞭な円形のコロニー形態を示し、ヒト ES 細胞のコロニーに類似した形態が認められた。

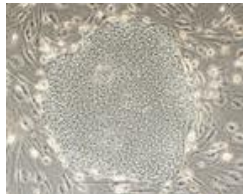


図2. ヒト iPS 細胞の位相差顕微鏡像

(3) ヒト歯髄細胞由来 iPS 細胞の characterization

①未分化細胞マーカー遺伝子の発現

未分化細胞マーカーである Oct3/4、Sox2、Nanog、Rex1、DPPA5、DNMT3B の遺伝子発現を RT-PCR で解析したところ、全ての遺伝子発現が検出された (図3)。

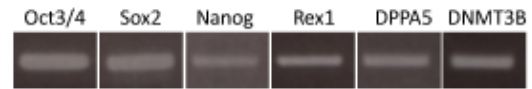


図3. 未分化細胞マーカー遺伝子の発現

②SSEA-4 の発現

未分化細胞マーカーである SSEA-4 の発現を免疫染色で解析したところ、発現が陽性であった (図4)。

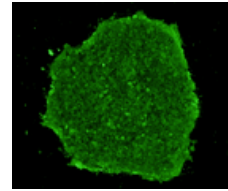


図4. ヒト iPS 細胞における SSEA-4 発現

③ALP 染色

ALP 染色を行った結果、樹立したヒト iPS 細胞は ALP 陽性であった (図5)。

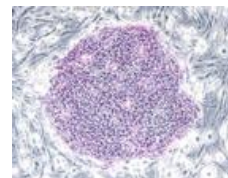


図5. ALP 染色したヒト iPS 細胞

④核型解析

核型解析の結果、樹立したヒト iPS 細胞に核型異常は認められなかった (図6)。

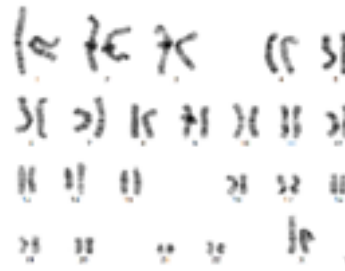


図6. 核型解析結果

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8件)

1. Kimura K, Kitaura H, Fujii T, Hakami ZW, Takano-Yamamoto T, Anti-c-Fms antibody inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in vivo, FEMS Immunol Med Microbiol, 査読有, Vol. 64, 2012, 219-227
2. Kawaki H, Kubota S, Suzuki A, Suzuki M, Kohsaka K, Hoshi K, Fujii T, Lazar N, Ohgawara T, Maeda T, Perbal B, Takano-Yamamoto T, Takigawa M, Differential roles of CCN family proteins during osteoblast

- differentiation: Involvement of Smad and MAPK signaling pathway, Bone, 査読有, Vol.49, 2011, 975-989
3. Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Saito M, Tsuji T, Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy, PLoS One, 査読有, Vol. 6, 2011, e21531
 4. Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto E, Masuyama R, Yoshida N, Takano-Yamamoto T, IL-12- and IL-18-mediated, nitric oxide-induced apoptosis in TNF- α -mediated osteoclastogenesis of bone marrow cells, Calcif Tissue Int, 査読有, Vol. 89, 2011, 65-73
 5. Sugawara Y, Ando R, Kamioka H, Ishihara Y, Honjo T, Kawanabe N, Kurosaka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T, The three-dimensional morphometry and cell-cell communication of the osteocyte network in chick and mouse embryonic calvaria, Calcif Tissue Int, 査読有, Vol. 88, 2011, 416-424
 6. Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T, Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats, Dev Biol, 査読有, Vol. 350, 2011, 337-347
 7. Murakami T, Fukunaga T, Takeshita N, Hiratsuka K, Abiko Y, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T, Expression of Ten-m/Odz3 in the fibrous layer of mandibular condylar cartilage during postnatal growth in mice, J Anat, 査読有, Vol. 217, 2010, 236-244
 8. Seiryu M, Deguchi T, Fujiyama K, Sakai Y, Daimaruya T, Takano-Yamamoto T, Effects of CO₂ laser irradiation of the gingiva during tooth movement, J Dent Res, 査読有, Vol. 89, 2010, 537-542
- [学会発表] (計22件)
1. 山本照子, 矯正の歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析, 平成23年度共同研究会「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」(招待講演), 2012年3月12日, 京都
 2. 解良洋平、山本照子他, Methionine adenosyltransferase (MAT1B)-dependent writing of histone H3K9 methylation of Cox2 gene, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13-16日, 横浜
 3. 山本照子, なぜ歯は動くのか?-矯正の歯の移動の分子メカニズム-, 第70回日本矯正歯科学会大会(招待講演), 2011年10月17-20日, 名古屋
 4. 大島正充、池田悦子、山本照子他, 再生歯ユニット移植による歯の生理的機能の再生, 第70回日本矯正歯科学会大会, 2011年10月17-20日, 名古屋
 5. 水野光政、池田悦子、山本照子他, 再生歯ユニットの作製と生体顎骨への生着解析, 第70回日本矯正歯科学会大会, 2011年10月17-20日, 名古屋
 6. Kitaura H, Takano-Yamamoto T et al., IL-12- and IL-18-mediated nitric oxide-induced apoptosis in TNF- α -mediated osteoclastogenesis., The 4th International Congress and the 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society, 2011.10.17-20, Nagoya
 7. Kimura K, Takano-Yamamoto T et al., Anti-c-Fms antibody inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in vivo, The 4th International Congress and the 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society, 2011.10.17-20, Nagoya
 8. Fujii T, Takano-Yamamoto T et al., Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor- α -mediated osteoclast formation in vivo., The 4th International Congress and the 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society, 2011.10.17-20, Nagoya
 9. 川木晴美、山本照子他, 骨芽細胞分化におけるCCNファミリータンパク質の分布と機能解析, 第53回歯科基礎医学会, 2011年9月30日, 岐阜
 10. 川木晴美、山本照子他, CCNファミリータンパク質によるMAPK経路を介した骨芽細胞増殖・分化調節, 第4回日本CCNファミリー研究会, 2011年8月27日, 岡山
 11. Terao F, Takano-Yamamoto T et al., FGF10 contributes Meckel's cartilage formation in early mandibular development, The 6th International Workshop on Mano-

Bio- and Amorphous Materials,
2011.8.9, Togatta

- 1 2. 解良洋平、山本照子他、S-アデノシル
メチオニン合成酵素MATIIによるエ
ピゲノム制御と転写調節、第77回日
本生化学会東北支部例会、2011年
7月23日、仙台
- 1 3. 寺尾文恵、山本照子他、胎生期下顎形
成期におけるFGF10によるメッケル
軟骨形態の制御、第29回日本骨代謝
学会学術集会、2011年7月28-
30日、大阪
- 1 4. 水野光政、山本照子他、再生歯による
移植システムの開発(1)一再生歯ユ
ニットの作製と成体顎骨への生着の
解析一、第10回日本再生医療学会総
会、2011年3月2日、東京
- 1 5. 大島正充、山本照子他、再生歯によ
る移植システムの開発(2)一再生歯
ユニットによる歯槽骨と歯の生理機
能の回復、第10回日本再生医療学会
総会、2011年3月2日、東京
- 1 6. Takano-Yamamoto T. Orthodontic
treatment using mini-screw
anchorage for patients with
temporomandibular joint
dysfunction, 2nd World Implant
Orthodontic Congress (WIOC) (招待
講演), 2010.12.11, Taipei
- 1 7. 大島正充、山本照子他、歯の機能的な
再生(I):再生歯ユニットの作製と
成体顎骨への生着の解析、第33回日
本分子生物学会年会、2010年12
月10日、神戸
- 1 8. 今村彩、山本照子他、歯の機能的な再
生(II):再生歯ユニット移植による
歯の生理的機能の再生、第33回日
本分子生物学会年会、2010年12月
10日、神戸
- 1 9. Takano-Yamamoto T. Orthodontic
treatment using mini-screw
anchorage for patients with
temporomandibular joint
dysfunction., 3rd Asian
Micro-Implant Anchorage Congress,
2010.11.12, Bangkok
- 2 0. 水野光政、山本照子他、機能的な歯の
再生(I):機能的な歯の構造体:再生
歯ユニットの作製技術の開発、第8回
日本再生歯科医学会学術大会・総会、
2010年10月30日、名古屋
- 2 1. 大島正充、山本照子他、機能的な歯の
再生(II):再生歯ユニット移植による
生体顎骨への生着と歯槽骨再生、第8
回日本再生歯科医学会学術大会・総会、
2010年10月30日、名古屋
- 2 2. 山崎大道、山本照子他、機能的な歯の

再生(III):再生歯ユニット移植による
歯の生理的機能の再生、第8回日本再
生歯科医学会学術大会・総会、201
0年10月30日、名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 照子 (Teruko Takano-Yamamoto)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号:00127250

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

池田 悦子 (Etsuko Ikeda)
東北大学・病院・講師
研究者番号:20509012