

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659858

研究課題名(和文) iPS細胞技術を基盤とした歯槽骨吸収リスクの術前診断法の創生

研究課題名(英文) Development of the iPS cell-based diagnostic technology for dental treatments

研究代表者

江草 宏 (Egusa, Hiroshi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30379078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：個々の患者から作製可能なiPS細胞(人工多能性幹細胞)は、試験管内で患者固有の生体反応を再現するツールとなる可能性を秘めている。本研究では、患者歯肉細胞から、エピソードプラスミドを用いてウイルスフリーのiPS細胞株の作製を試み、これに成功した。次に、マウス歯肉由来iPS細胞を用いた検討を行い、iPS細胞を凝集体の状態での分化誘導することにより、ハイドロキシアパタイト結晶構造を有する成熟な骨芽細胞への分化が可能であることを明らかにした。本研究の成果は、将来的に染色体に遺伝子挿入のないiPS細胞を骨芽細胞に分化誘導することで分化過程の個体差を検出していく技術に繋がる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem (iPS) cells, which can be generated individual patients, have potential to represent the patient-specific cell responses in vitro. In this study, we attempted to generate integration-free iPS cells from patients' gingiva using episomal plasmid vectors, and successfully generated iPS cell clones. We next evaluated optimal osteogenic induction of iPS cells using mouse gingiva-derived iPS cells, demonstrating that iPS cells can be guided to differentiate into mature osteoblasts with hydroxyapatite formation. These results suggest that the firm method to guide integration-free iPS cells to differentiate into osteoblasts may lead to a new technology for detecting individual differences in the clinical outcome of bone regeneration.

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：iPS細胞 骨芽細胞 個体差

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療の急速な普及を背景に、骨増生術などの治療術式の進歩は目覚ましい。一方で、同様の再生医療術式を施したにもかかわらず、治療後の歯槽骨吸収に「個人差」を認めることは臨床的な事実である。また、総義歯装着者の顎堤は徐々に吸収していくが、その程度や速度に関しても非常に大きな「個人差」があることから (Carlsson GE. Gerodontology, 2004), 歯槽骨吸収には、骨代謝を司る骨芽細胞/破骨細胞のレベルで「個人差」が存在している可能性がある。ただし、現在の補綴歯科治療には、歯槽骨吸収の個人差を評価するための分子生物学的な診断法はなく、治療経過は患者の治療能力に頼らざるを得ないのが現状である。

これらの細胞における個人差を評価するためには、患者の組織を研究試料に用いることが必要となるが、健全な歯槽骨を採取することはきわめて困難である。

一方で、個々の患者から作製可能な iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) は、どんな細胞にもなれる万能細胞であるため、試験管内で患者固有の生体反応を再現するツールとなる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究では、患者の歯肉から作製した iPS 細胞を試験管内で骨芽細胞に誘導し、その分化能の評価が、骨組織再生の術前診断技術の基盤技術となる可能性を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

初年度 (平成 24 年度) は、大阪大学歯学部附属病院・口腔補綴科を受診した患者を対象に、歯科治療の際に切除された歯肉から線維芽細胞を分離培養した。分離培養した歯肉線維芽細胞から、江草らの方法 (PLoS ONE, 2010) に従い iPS 細胞を作製した。ただし、ウイルスベクターを用いて iPS 細胞を樹立した場合、染色体上に遺伝子を挿入してしまうため、予期しない遺伝子の活性化や抑制が起こる可能性があり、iPS 細胞の個体差の解析に影響を及ぼすことが危惧される。そこで、ウイルスベクターの代わりにエピソーマルプラスミドを用いて iPS 細胞の樹立を試みた。

作製した iPS 細胞株について、リアルタイム RT-PCR 解析 (ES 細胞特異的な遺伝子発現の評価) およびテラトーマ形成実験 (多分化能評価) を用いて評価した。

次年度 (平成 25 年度) は、iPS 細胞の確実な骨芽細胞分化誘導法を確立するため、マウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞を用いた誘導条件の至適化について検討を行った。

4. 研究成果

ウイルスベクターの代わりにエピソーマルプラスミドを用い、患者由来歯肉線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を試みた結果、皮膚線

維芽細胞を用いた場合と比較して約 10 倍以上の効率で ALP 陽性の ES 細胞様コロニーの形成を認めた。

リアルタイム RT-PCR 解析の結果、作製した iPS 細胞株は ES 細胞特異的な遺伝子を発現していた。また、テラトーマ形成実験の結果、作製した iPS 細胞株は三胚葉に由来する組織細胞への多分化能を示し、ES 細胞と同様の性質を有した iPS 細胞であることが確認された。

マウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞を用い、iPS 細胞の確実な骨芽細胞分化誘導法の検討を行った結果、iPS 細胞を凝集体の状態での分化誘導することにより、骨基質の豊富なハイドロキシアパタイト結晶構造を有する成熟な骨芽細胞への分化が可能であることが明らかとなった。

本研究の成果は、将来的に染色体に遺伝子挿入のない iPS 細胞を骨芽細胞に分化誘導することで分化過程の個体差を検出していく技術に繋がる可能性があり、今後の研究の発展が期待される。

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 7 件)

Egusa H, Kayashima H, Miura J, Uraguchi S, Wang F, Okawa H, Sasaki J-I, Saeki M, Matsumoto Y, Yatani H: Comparative analysis of mouse induced pluripotent stem cells and mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation in vitro. Stem Cells Dev, 査読有: 印刷中. doi:10.1089/scd.2013.0344.

江草 宏: iPS 細胞の骨生物学への応用と歯科臨床への展望. 医学生物学電子顕微鏡技術学会誌, 査読無, 27 (2): 印刷中.

江草 宏, 于 冠男, 鎌野優弥, 大川博子, 山本治毅, 矢谷博文: 歯肉を用いた医療応用に安全な iPS 細胞の開発. 新たな再生歯科医療技術の創成に向けて. 日歯医学会誌, 査読有, 33: 54-58: 2014.

Arakaki M, Egusa H, Otsu K, Saito I, Miura T, Harada H: Frontier dental research on iPS cells. Journal of Oral Biosciences, 査読有, 55(4): 191-199, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2013.08.002>

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K: Stem cells in dentistry-Part II: Clinical applications. Journal of Prosthodontic Research, 査読有, 56(4): 229-248, 2012.

doi: 10.1016/j.jprior.2012.06.001

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K: Stem cells in dentistry-Part I: Stem cell sources. Journal of Prosthodontic Research, 査読有, 56(3): 151-165, 2012.

doi: 10.1016/j.jprior.2012.06.001

江草 宏, 西村一郎:(対談) iPS細胞と遺伝子診断で進化する再生医療～最先端の Personalized Dentistry .GC Circle, 査読無: 142: 4-11, 2012.

[学会発表](計16件)

江草 宏, Application of iPS Cells in bone biology, Kyudai Oral Bioscience 2014 国際シンポジウム “ Oral Stem Cells”, 2014年2月28日(福岡市).

江草 宏, iPS Cells in Regenerative Dental Medicine, The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science 国際シンポジウム “ Cell Manipulation and Tissue Regeneration”, 2014年1月21日(仙台市).

江草 宏, Stem cells in regenerative dental medicine, 2013 Thailand International Conference on Oral Biology 国際シンポジウム “ Stem Cells and Tissue Engineering”, 2013年11月28日(Bangkok, Thailand).

江草 宏, iPS細胞が可能にする歯科医療とは, 平成25年度日本補綴歯科学会関西支部学術大会 生涯学習公開セミナー「歯科におけるバイオサイエンスの基礎と応用」, 2013年11月24日(大阪市).

江草 宏, 歯肉から作る iPS細胞が可能にする歯科医療とは, 第25回日本小児口腔外科学会学術大会 シンポジウム「小児口腔外科と再生医療」, 2013年11月2日(東京都).

江草 宏, iPS細胞を用いたスキャフォールドフリー骨組織再生, 第55回歯科基礎医学学会学術大会 シンポジウム

「Biodental Engineering ~ バイオ研究と材料科学の融合 ~」, 2013年9月22日(岡山市).

江草 宏, iPS細胞の骨生物学への応用と歯科臨床への展望, 第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会 特別講演, 2013年6月9日(横須賀市).

江草 宏, iPS細胞の骨形成能と歯科臨床への展望, 第67回日本口腔科学会学術集会 シンポジウム「歯周組織における再生医療」, 2013年5月23日(宇都宮市).

江草 宏, Application of gingiva-derived iPS cell technologies in regenerative dental medicine, International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative 国際シンポジウム “ Regenerative Dental Medicine”, 2013年2月16日(Cha-am, Thailand).

江草 宏, Application of gingiva-derived iPS cell technologies in dental research, 第60回国際歯科研究学会日本部会(JADR)学術大会 国際シンポジウム “ Clinically Relevant Basic Research in the Prosthodontic Field”, 2012年12月15日(新潟市).

江草 宏, Application of gingiva-derived iPS cells in bone biology, The 2nd International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference 国際シンポジウム “ Stem Cells and Tissue Engineering”, 2012年12月7日(Chiang Mai, Thailand).

江草 宏, 歯肉から作る万能細胞(iPS細胞)が可能にする歯科医療とは, 神奈川歯科大学学会 研究談話会講演, 2012年11月20日(横須賀市).

江草 宏, 歯肉由来 iPS細胞の歯科医学への応用, 第54回歯科基礎医学学会学術大会 シンポジウム「口腔領域における iPS研究の現状と展望」, 2012年9月14日(郡山市).

江草 宏, iPS細胞の骨生物学への応用, 硬組織再生生物学会 第21回学術大会 特別講演, 2012年8月25日(名古屋市).

江草 宏, Gingiva-derived iPS cells: A promising tool for dental applications, 大阪大学歯学部・大学院歯学研究科「口の難病から挑むライフ・イノベーション」プロジェクト 日本・韓国国際シンポジウム “ Development and Regeneration of Oro-Facial Structures” 2012年7月13日(吹田市).

江草 宏, Gingiva-derived iPS cells: A promising tool for dental applications, The 90th IADR General Session 国際シンポジウム “ Stem Cell Niches and Pluripotent Stem Cells for Craniofacial Regeneration”, 2012年6

月 20 日 (Iguacu Falls, Brazil) .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江草 宏 (EGUSA, Hiroshi)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 30379078

(2) 研究分担者

矢谷 博文 (YATANI, Hirofumi)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号 : 80174530

中野 環 (NAKANO, Tamaki)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 40379079