

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659907

研究課題名(和文) ヒト・エピソーマル 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 fundamental technologies for tooth regeneration using human episomal iPS cells

研究代表者

山本 照子 (Takano-Yamamoto, Teruko)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00127250

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)：本研究では、歯周組織由来細胞からヒト・エピソーマル iPS 細胞を樹立し、歯の再生を目指した基盤技術の開発を行った。細胞ソースの探索として、既に我々が樹立したヒト歯髄細胞由来 iPS 細胞に加えて、歯根膜細胞、歯乳頭細胞、歯小囊細胞由来のエピソーマル iPS 細胞を樹立した。ヒト歯髄由来 iPS 細胞を用いてテラトーマを形成した結果、三胚葉性の組織像が認められた。マウス iPS 細胞由来の神経堤様細胞に Pax9 発現プラスミドを導入した結果、DMP1 の発現が亢進した。また誘導したマウス iPS 細胞由来神経堤様細胞を用いてスフェロイドを形成した結果、歯胚間葉細胞で発現が認められる転写因子の発現が亢進した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we established human episomal iPS cells to develop fundamental technologies for artificial tooth regeneration. We generated human episomal iPS cells derived from periodontal ligament cells, dental papilla cells, and dental follicle cells. We tested teratoma formation of dental pulp cell-derived iPS cells. As a result, tissues derived from three germ layers were observed. We performed transfection of Pax9-expression plasmid into neural crest-like cells (NCLCs) derived from murine iPS cells. The expression of DMP1 was upregulated in the Pax9-overexpressing NCLCs. Moreover, NCLC sphere showed induction of mRNA expressions of transcription factors that were expressed in mesenchymal cells of tooth germs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：ヒト・エピソーマル iPS 細胞 遺伝子導入 再生医学 歯科

## 1. 研究開始当初の背景

歯の先天欠如や、齲蝕、歯周炎、外傷に起因する後天的な歯の喪失など、種々の原因による歯の欠損が認められる患者に対して矯正歯科治療を行う場合、最終的な歯の欠損部を人工材料によって補う必要のある症例が少なくない。しかし近年、組織から採取した細胞を用いて人工歯胚を再生させる研究が進み、歯の欠損部へ再生歯を移植するという歯の再生医療実現への期待が高まってきている。

再生医療への応用が期待される幹細胞としてES細胞や体性幹細胞が知られているが、最近、山中らが、マウス (Takahashi and Yamanaka, Cell, 2006)、さらに、ヒトの人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を作製し (Takahashi et al, Cell, 2007)、現在 iPS細胞を用いた再生医療の実現に向けた研究が多方面で活発に行われている。2011年に沖田、山中らは、染色体を傷つけず、癌化しにくいエピソーマル iPS細胞の樹立方法を開発し (Okita K et al., Nat Methods, 2011)、iPS細胞の臨床応用に大きな弾みをつけた。

## 2. 研究の目的

本研究では、将来の臨床応用を目的として、ヒト歯周組織由来細胞からヒト・エピソーマル iPS細胞を樹立し、これに歯胚上皮・間葉に特異的な遺伝子を導入することにより、歯胚形成細胞へと分化誘導して細胞シーズを確保し、これを用いてヒト人工歯の作製を実現することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 歯周組織由来細胞を用いたヒト・エピソーマル iPS細胞の樹立

矯正歯科治療のために抜去された歯から、歯髓細胞、歯根膜細胞、歯小囊細胞、および歯乳頭細胞を採取した。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。

(2) ヒト・エピソーマル iPS細胞を用いたテラトーマの誘導

ヒト歯髓細胞由来 iPS細胞を免疫不全マウスの精巣に移植した。細胞投与後9-12週で、形成されたテラトーマを摘出し、パラフィン切片を作製して、H-E染色により組織像を観察した。

(3) マウス iPS細胞から神経堤様細胞 (NCLC) の誘導

マウス iPS細胞を神経誘導培地中にて浮遊培養し、スフェロイドを形成した。スフェロイドをフィブロネクチンコートディッシュ上で培養することにより、NCLCを誘導した。

(4) マウス iPS細胞由来神経堤様細胞 (NCLC) への Pax9 発現プラスミドの導入  
マウス Pax9 の発現プラスミドを作製し、エレクトロポレーションにより NCLC への導入を行った。遺伝子導入後2日目に RNA を精製して、リアルタイム PCR による解析の試料とした。

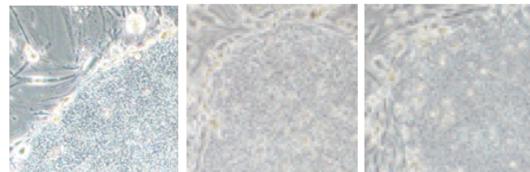
(5) マウス iPS細胞を用いたスフェロイド形成

NCLC を樹立し、それらを浮遊培養することにより、スフェロイドの形成を行った。得られたスフェロイドから RNA を精製し、リアルタイム PCR による解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 歯周組織由来細胞を用いたヒト・エピソーマル iPS細胞の樹立

既に我々が樹立したヒト歯髓細胞由来 iPS細胞に加えて、歯根膜細胞、歯乳頭細胞、歯小囊細胞から iPS細胞を誘導した。得られた細胞は、ES細胞様のコロニー形成を示した。



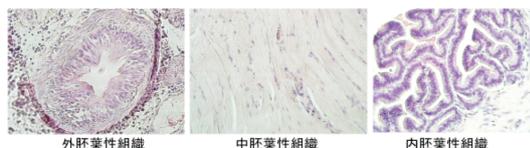
歯根膜細胞由来 歯乳頭細胞由来 歯小囊細胞由来

(2) ヒト・エピソーマル iPS細胞における未分化細胞マーカーの発現

歯髓細胞由来 iPS細胞における、未分化細胞マーカー発現を RT-PCR で解析した結果、Oct3/4、Sox2、Nanog、Rex1、DPPA5、DNMT3B の発現が認められた。また、樹立した iPS細胞における SSEA-4 の発現を免疫蛍光で解析した結果、陽性シグナルが認められた。さらに、ALP染色を行った結果、樹立したヒト iPS細胞は ALP 陽性を示した。

(3) ヒト歯髓細胞由来 iPS細胞は三胚葉由来組織に分化する

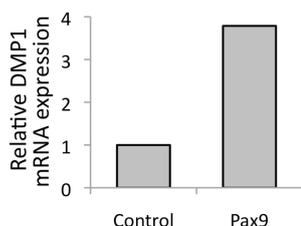
ヒト歯髓細胞由来 iPS細胞の多分化能を、テラトーマ形成により解析した。その結果、外胚葉、中胚葉、内胚葉由来と考えられる組織像が認められた。



(4) 外因性 Pax9 発現により NCLC における DMP1 発現が亢進する

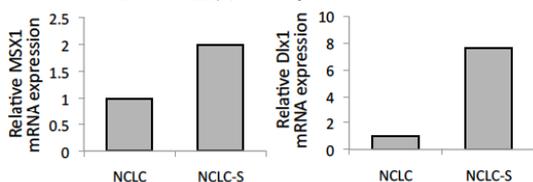
将来的な、遺伝子導入によるヒト iPS細胞から歯性細胞への誘導を目指した基盤的知見を得るために、NCLCへ Pax9 発現プラスミドを遺伝子導入し、DMP1 発現への影響を解析した。その結果、外因性 Pax9 発現による

DMP1 の発現亢進が認められた。



(5) NCLC のスフェロイドにおいて Msx1、Dlx1 発現が亢進する

NCLC を 3 次元的に培養し、歯性間葉細胞において発現する転写因子発現への影響を解析した。その結果、NCLC スフェロイドにおける Msx1、Dlx1 の発現は、単層培養した NCLC に比べて上昇した。



NCLC, マウスiPS細胞由来神経堤様細胞; NCLC-S, NCLCスフェロイド

#### 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 10 件)

1. Takano-Yamamoto: Osteocyte function under compressive mechanical force, Japanese Dental Science Review, 50(2):29-39, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2013.10.004>, 査読有
2. Hoshi K, Kawaki H, Takahashi I, Takeshita N, Seiryu M, Murshid SA, Masuda T, Anada T, Kato R, Kitaura H, Suzuki O, Takano-Yamamoto T : Compressive Force-Produced CCN2 Induces Osteocyte Apoptosis Through ERK1/2 Pathway, J Bone Miner Res. 2014, 29, 1244-1257 DOI: 10.1002/jbm.2115, 査読有
3. Kimura K, Kitaura H, Fujii T, Ishida M, Hakami Z, Takano-Yamamoto T. An anti-c-Fms antibody inhibits osteoclastogenesis in a mouse periodontitis model. *Oral Diseases*. (in press) 、2014;20(3):319-24. doi: 10.1111/odi.12117, 査読有
4. Nonaka S, Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Takano-Yamamoto T : Immunological Expression of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) and PAC1 in the Periodontal Ligament After Tooth Luxation. *Cell Mol Neurobiol*. 33(7):885-92, 2013, doi: 10.1007/s10571-013-9953-4, 査読有
5. Chida T, Ando M, Matsuki T, Masu Y, Nagaura Y, Takano-Yamamoto T, Tamura

S, Kobayashi T: N-myristoylation is essential for protein phosphatases PPM1A and PPM1B to dephosphorylate their physiological substrates in cells. *Biochem J* 449(3):741-9, 2013, doi: 10.1042/BJ20121201., 査読有

6. Kimura K, Kitaura H, Fujii T, Hakami Z, Takano-Yamamoto T: Anti-c-Fms antibody inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in vivo. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 64(2), 219-227. 2012, doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00888.x., 査読有
7. Nagayama T, Seiryu M, Deguchi T, Kano M, Suzuki T, Takano-Yamamoto T, Ichikawa H. Increase of CGRP-Containing Nerve Fibers in the Rat Periodontal Ligament After Luxation. *Cell Mol Neurobiol*. 32(3):391-397, 2012, doi: 10.1007/s10571-011-9767-1., 査読有
8. Fujii T, Kitaura H, Kimura K, Hakami ZW, Takano-Yamamoto T: IL-4 inhibits TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation by inhibition of RANKL expression in TNF- $\alpha$ -activated stromal cells and direct inhibition of TNF- $\alpha$ -activated osteoclast precursors via a T-cell-independent mechanism in vivo. *Bone*, 51(4):771-780, 2012, doi: 10.1016/j.bone., 査読有
9. Honjo T, Kubota S, Kamioka H, Sugawara Y, Ishihara Y, Yamashiro T, Takigawa M, Takano-Yamamoto T: Promotion of Ccn2 expression and osteoblastic differentiation by actin polymerization, which is induced by laminar fluid flow stress *J Cell Commun Signal*. 6(4):225-32, 2012, doi: 10.1007/s12079-012-0177-z., 査読有
10. Kim S, Seiryu M, Okada S, Kuroishi T, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y : Analgesic effects of the non-nitrogen-containing bisphosphonates etidronate and clodronate, independent of anti-resorptive effects on bone. *Eur J Pharmacol*. 699(1-3):14-22, 2012, doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.031., 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. 北浦英樹、野中紗弥子、出口徹、木村桂介、石田匡彦、山本照子 : 侵襲刺激後の神経ペプチド pituitary adenylate cyclase activating polypeptide(PACAP)の歯根膜での発現、第 72 回 日本矯正歯科学会大会、松本、2013 年 10 月 7 日~9 日
2. 竹下信郎、長谷川正和、佐々木紀代、関大輔、宮下俊郎、高野郁子、宮島悠旗、福野佐知子、山本照子、牽引力は CTGF シグナルを介して頭蓋縫合における血管形成を促進する、第 72 回日本矯正歯

- 科学会大会、松本、2013年10月7日～9日
3. 木村桂介、北浦英樹、石田匡彦、ハカミザキ ウェリ、杉澤晴紀、ジャフアリ サイド、山本照子：マウス歯周病モデルを用いた破骨細胞形成および骨吸収に対する抗c-Fms抗体の抑制効果の検討、第72回日本矯正歯科学会、長野県松本市、2013年10月7日～9日
  4. 山本照子：圧縮力による骨細胞のアポトーシスに対するCTGF/CCN2の役割、第55回歯科基礎医学学会学術大会、岡山、2013年9月20-22日
  5. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Saeed J, Hakami ZW, Takano-Yamamoto T. IFN- $\gamma$  inhibits TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation in vitro and in vivo and induces apoptosis by Fas/Fas ligand interactions. 8th International Workshop on Biomaterials in Interface Science. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2013, Zao, Miyagi, Japan. 2013年8月29-30日
  6. Hakami ZW, Kitaura H, Honma S, Wakisaka S, Takano-Yamamoto T: Histochemical evaluation of glycoproteins in the developing rat palatine glands. The 2nd Meeting of the International Association for Dental Research-Asia Pacific Region 2013, Bangkok, Thailand. 2013年8月21-23日
  7. Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T: The transcription factor FoxC1 up-regulates PTHrP expression together with Gli2 in chondrocytes. The 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, Japan, May 28-June 1, 2013.
  8. Kitaura H, Kimura K, Zaki Weil-Hakami, Ishida M, Sugisawa H, Takano-Yamamoto T: IL-4 Inhibits TNF- $\alpha$ -mediated Osteoclast Formation via a T-cell-independent Mechanism *in vitro* and *in vivo*. NIDCR-Tohoku University Graduate School of Dentistry Symposium, 2013年5月10日、仙台
  9. Takano-Yamamoto T: Osteocyte function under mechanical compressive force、NIDCR-Tohoku University Graduate School of Dentistry Symposium, 2013年5月10日、仙台
  10. Takeshita N, Hasegawa M, Sasaki K, Seki D, Miyashita S, Takano I, Fukuno S, Takano-Yamamoto T: Tensile force induces vascular formation in cranial sutures via CTGF signaling. NIDCR-Tohoku University Graduate School of Dentistry Symposium, 2013年5月10日、仙台
  11. 山本照子：矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析、再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」、京都、2013年3月15日
  12. Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T: The transcription factor FoxC1 regulates chondrogenesis together with Gli2 through induction of PTHrP. 第34回 American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, USA, 2012年10月12月15日
  13. Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T: The transcription factor FoxC1 regulates chondrogenesis together with Gli2 through induction of PTHrP, Australian & New Zealand Bone & Mineral Society 22nd Annual Scientific Meeting in conjunction with 1<sup>st</sup> Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting, Pan Pacific Hotel, Perth, Western Australia, September 2-5, 2012.
  14. 山本照子：機械的刺激に対する骨細胞の応答能、第121回日本補綴学会、横浜、2012年5月25日
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  
 竹下 信郎 (Nobuo Takeshita)  
 東北大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：50431515
- 池田 悦子 (Etsuko Ikeda)  
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師  
 研究者番号：20509012