

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890201

研究課題名(和文) 歯周組織再生を目指したヒト骨芽細胞のダイレクト・リプログラミング

研究課題名(英文) Direct reprogramming of functional human osteoblasts for periodontal tissue regeneration

研究代表者

山本 健太 (Yamamoto, Kenta)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00636160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病の進行に伴う歯槽骨吸収は、歯牙の喪失につながり患者のQOLを著しく低下させる。自己骨芽細胞を、この骨吸収局所に効率よく供給することが出来れば、歯槽骨の再生につながり、歯牙の喪失を回避出来る可能性がある。そこで本研究では、細胞採取における侵襲性が少ない体細胞から骨芽細胞を直接誘導する方法を樹立することを目的とした。

その結果、ヒトの体細胞から高い効率でALP陽性の細胞を誘導することに成功した。この細胞は骨芽細胞関連遺伝子群を強力に発現し、石灰化基質の産生も行うことが確認された。本研究の結果から、本技術が歯周病に伴う歯槽骨吸収に対して、新しい再生医療をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alveolar bone resorption associated with advanced periodontitis causes tooth loss and reduces quality of life (QOL). Transplantation of autologous osteoblasts into periodontal tissue may facilitate alveolar bone regeneration as a new cell therapy. In this study, we attempted to directly reprogram human somatic cells into osteoblast-like cells by transducing some transcription factor genes. ALP positive cells were induced from somatic cells at a high efficiency, and the resultant cells expressed osteoblast-specific factors and produced mineralized bone matrix. Moreover, the resultant cells displayed a similar gene expression profile as normal human osteoblasts. These findings suggest successful reprogramming of somatic cells directly into osteoblasts, which may provide new regenerative medicine for periodontal diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：再生歯学

キーワード：再生医療 骨芽細胞 ダイレクト・リプログラミング

科学研究費助成事業（学術研究助成補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔領域において最も罹患率の高い疾患であり、歯周組織の炎症と歯槽骨の吸収を呈する。歯周組織の炎症に対しては既存の歯周病治療が有効であるが、歯槽骨の吸収に対する治療法は未だ確立されていない。そのため重度の歯周病患者は歯牙を喪失し、著しく ADL が低下する現状がある。

骨芽細胞は、骨基質を産生して骨形成に関与し、骨リモデリングにおける中心的な役割を演じる。そこで自己（患者由来）の骨芽細胞を骨吸収部の局所に効率良く供給出来れば、歯周病により失われた、歯槽骨の再生につながると期待できる。

自家骨芽細胞の調整には、現状では間葉系幹細胞や iPS 細胞を用いる方法が想定しうるが、臨床応用を阻む多くの課題がある。一方最近になって、心筋細胞や肝細胞などが、線維芽細胞から直接誘導できることが示された。この方法では臨床応用を阻む多くの課題が解決されると期待されている。

2. 研究の目的

歯周病は日本人成人の 80%が罹患しているといわれ、歯周病の進行に伴う歯槽骨の吸収は、歯牙を喪失する最も主要な原因となっている。患者由来の骨芽細胞を、歯槽骨の吸収部位に移植すれば、歯牙の喪失を予防し、患者の ADL を著明に改善できる可能性がある。

本研究では、ヒト体細胞に、骨芽細胞に特徴的な転写因子等の遺伝子を導入することにより、骨芽細胞を直接分化誘導することを目的とする。本研究の成果は、歯槽骨吸収に対する画期的新治療技術を提供する可能性が

ある。

3. 研究の方法

- 1) 細胞 ヒト由来正常細胞を用いた。
- 2) 遺伝子導入 遺伝子組換え実験は適正な審査を受けて行った。骨芽細胞の分化に関与する転写因子等の遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを構築した。これらを種々の組み合わせで上記の細胞に感染後、種々の条件で培養した。
- 3) 染色 Alkaline phosphatase 染色、Alizarin Red S 染色および von Kossa 染色を定法のとおりに行った。
- 4) 遺伝子発現解析 Real time RT-PCR、および DNA マイクロアレイで解析した。
- 5) 細胞移植 動物実験は適正な審査を受けて行った。免疫不全マウスの大腿骨に、骨欠損を作成した。この骨欠損部、または精巣皮膜下に、誘導した骨芽細胞を移植した。
- 6) 骨芽細胞の生着および骨形成の評価 マイクロ CT 撮像、および組織学的、免疫組織化学的評価にて行った。

4. 研究成果

- 1) ダイレクト・リプログラミング法の最適化 種々の遺伝子の組み合わせを体細胞に導入したところ、特定の遺伝子のセットを導入した場合に、Alkaline phosphatase (ALP) 陽性の細胞が誘導された。得られた細胞は、元の体細胞と比し、骨芽細胞特異的遺伝子を強かに発現していた。誘導骨芽細胞は、骨関連タンパクを発現するとともに、石灰化骨基質の産生も行うことが確認された (図 1)。また DNA chip 解析によるゲノムワイドな遺伝子発現解析においても正常骨芽細胞と類似した遺伝子

パターンを示した。

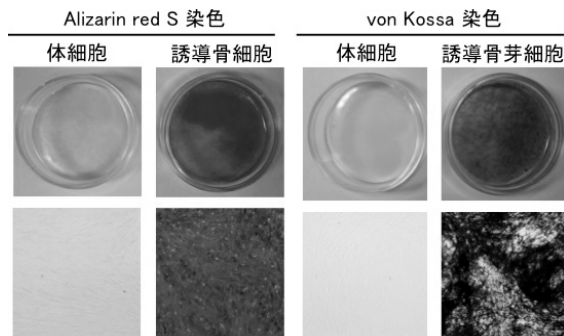


図 1：我々が体細胞から直接誘導した骨芽細胞は、石灰化した骨基質を産生する。

2) 作成したヒト骨芽細胞の生体内生着性および生体内骨形成能の解析

上記の手法で誘導した骨芽細胞を、免疫不全マウスの人為的骨欠損部に移植した群では、元の体細胞を移植した群と比し、顕著な骨再生を認めた (図 2)。また誘導骨芽細胞を精巣皮下に移植しても、テラトーマ形成は認めず、精巣内に石灰化沈着を認めた。

マイクロCT像

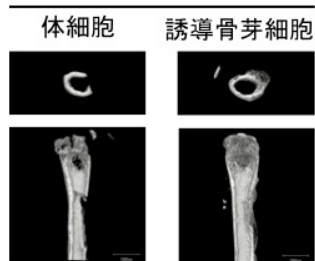


図 2：我々が体細胞から直接誘導した骨芽細胞は、免疫不全マウスの骨欠損を回復させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

- 1) β -cryptoxanthin regulates bone resorption related-cytokine production in human periodontal ligament cells. Nishigaki M, Yamamoto T, Ichioka H, Honjo K, Yamamoto K, Oseko F, Kita M, Mazda O, Kanamura N. Arch Oral Biol. 2013 Jul; 58: 880-886. (査読有り)
- 2) Marfan's syndrome: Clinical manifestations in the oral-craniofacial area, biophysiological roles of fibrillins and elastic extracellular microfibers, and disease control of the fibrillin gene. Nishikawa T, Yamamoto T, Honjo K, Ichioka H, Yamamoto K, Kanamura N, Kato H, Wato M, Kubo T, Mori M, Tanaka A. Asian J Oral Maxillofac Surg. 2013 Oct; 25: 374-388. (査読有り)

〔産業財産権〕

発明の名称：骨芽細胞及びその調製方法
発明者：山本健太，岸田綱郎，山本俊郎，松田修

出願番号：特願 2013-156025

出願人：京都府公立大学法人

出願日：2013 (平成 25) 年 7 月 26 日

発明の名称：骨芽細胞及びその調製方法
発明者：山本健太，岸田綱郎，山本俊郎，松田修

出願番号：特願 2014-012441

出願人：京都府公立大学法人

出願日：2014 (平成 26) 年 1 月 26 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 健太 (KENTA YAMAMOTO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：00636160

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし