

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462900

研究課題名(和文)間葉系幹細胞、iPS細胞を用いた骨組織再生法開発のための基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for development of osteoregeneration therapy using mesenchymal stem cells and iPS cells

研究代表者

東 俊文(Azuma, TOSHIFUMI)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00222612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織発生機序を間葉系幹細胞、iPS細胞を用いて解明した。骨組織を作る幹細胞の1つ、骨芽細胞から成熟した骨組織に存在する骨細胞に至る全細胞段階の分離に成功した。未熟な骨芽細胞を移植医療へ応用する前臨床研究として、骨欠損モデルラットに移植し良好な成績を得た。骨芽細胞分化前期においてはPI3K-Akt経路の活性化が必須であることを解明し、iPS細胞から骨芽細胞への分化誘導にIGF1投与が有効であることを示した。骨芽細胞マーカーであるALPが細胞表面抗原として応用可し、純度の高い骨芽細胞を得ることに成功した。患者iPS細胞の樹立、効率よい骨芽細胞分化誘導法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We developed new strategies to generate all stages of osteogenic cells including mesenchymal stem cells, pre-osteoblasts, osteoblast and osteocytes. These cells are expressed their specific marker proteins. We found that PI3K-Akt signaling is essential for early stage of osteogenesis. IGF-1, which is an effective stimulator of PI3K-Akt signaling is a potent inducer of osteogenesis. We found that IGF-1 treatment significantly improve osteogenesis. We established an effective protocol for generating osteocyte from iPS cells. We utilized this protocol to develop new strategy for osteo-regeneration therapy. We transplanted osteoblasts derived from human iPS cells to bone defects generated in Rat and found successful regeneration. We found that ALP is a specific and efficient surface marker to isolate osteolineage cells derived from iPS cells. We established effective protocol to generate osteoblast from human patient derived iPS cells.

研究分野：生化学

キーワード：iPS細胞 骨代謝 骨芽細胞 再生医療 疾患特異的iPS細胞 骨細胞 Wnt ヘッジホッグ

1. 研究開始当初の背景  
iPS 細胞が開発され、各方面においてその応用が重要となった。

2. 研究の目的  
顎骨疾患の新規治療法開発あるいは病態の解明に iPS 技術を応用する。

3. 研究の方法  
マウス及びヒト iPS 細胞を基に骨組織細胞へ分化誘導する方法を間葉系幹細胞を用いた方法を基盤に開発する。

4. 研究成果  
iPS 細胞から効率よく骨芽細胞、骨細胞へ分化誘導することが可能となった。

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 5 件)

**原著論文 3**

Ochiai H 1)2), Okada S 2), Saito A 2), Hoshi K 3), Yamashita H 4), Takato T 5), Azuma A 1)2).

Inhibition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression

by prolonged transforming growth factor-1 (TGF-1)

administration suppresses osteoblast differentiation.

J Biol Chem, 287(27), 22654-22661, 2012.

1) 東京歯科大学口腔科学研究センター、2) 東京歯科大学学生化学、3) 東京大学大学院医学系研究科軟骨・骨再生医療寄付講座、4) 東京歯科大学小児歯科学、5) 東京大学大学院医

学系研究科感覚・運動機能医学講座

DOI : 10.1074/jbc.M111.279091

PubMed ID : 22573330 研究課題番号: A04-0325-1

Kojima Y 1)3), Okamoto-Shibayama K 1)2), Sato Y 1)2), Azuma T 1)2).

gbc Gene Repertoire Variation among Mutans Streptococci.

Bull Tokyo Dent Coll, 53(2), 51-58, 2012.

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学

口腔科学研究センター、3) 総合病院国保旭中央病院歯科口腔外科

PubMed ID : 22790333 研究課題番号: A95-0120-1

Saito A 1), Ochiai H 1)3), Okada S 1), Miyata N 2), Azuma T 1)3).

Suppression of Lefty expression in induced pluripotent cancer cells.

FASEB J, 12, 221432, 2013.

1) 東京歯科大学学生化学、2) 慶應義塾大学医学部内科、3) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc8

DOI : 10.1096/fj.12-221432 PubMedID: 23407711 研究課題番号: A04-0325-1

Ochiai-Shino H, Kato H, Sawada T, Onodera S, Saito A, Takato T, Shibahara T, Muramatsu T, Azuma T.

A novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells based on surface marker combination.

PLoS One. 2014 Jun 9;9(6):e99534. doi: 10.1371/journal.pone.0099534.

Suzuki E, Ochiai-Shino H, Aoki H, Onodera S, Saito A, Saito A, Azuma T

Akt Activation is Required for TGF-β1-Induced Osteoblast Differentiation of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts.

PLoS One. 2014 Dec 3;9(12):e112566. doi: 10.1371/journal.pone.0112566.

Kato H, Ochiai-Shino H, Onodera S, Saito A, Takahiko Shibahara, Azuma T

Promoting effect of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte like cells

〔学会発表〕(計 33 件)

佐藤裕 1)、柴山和子 2)、石原和幸 2)、東俊文 1)

Campbell 様インテグレーション DNA 断片の Polymerase Chain Reaction (PCR)

法による in vitro 構築

歯科学報, 112(2), 157, 2012.

第 293 回東京歯科大学学会(例会) 千葉市

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学微生物学

研究課題番号: A95-0120-1

Saito A, Ochiai H, Okada S, Azuma T.

Reprogrammed cancer cells upregulate the expressions of angiogenesis related genes and reactive oxygen species scavenging genes.

第 38 回日本微小循環学会総会プログラム抄録集, 34, 2013.

第 38 回日本微小循環学会総会 東京都港区

東京歯科大学学生化学

東俊文 1)、落合宏美 1)、岡田晶子 1)、齋藤暁子 1)、星和人 2)、高戸毅 3)

ヒト iPS 細胞から純粋な骨芽細胞を得る方法の開発

第 12 回日本再生医療学会総会プログラム抄録集, 12, 178, 2013.

第 12 回日本再生医療学会総会 横浜市

1)東京歯科大学学生化学、2)東京大学大学院医学研究科軟骨・骨再生医療寄付講座、3)東京大学大学院医学研究科感覚・運動機能講座口腔外科学分野

## 学会発表・示説 11

Okada S, Ochiai H, Saitou A, Satou Y, Azuma T.

Regulation of Nodal-Lefty expression by TGF- $\beta$  in iPS cells derived from oral mucosal Tissue.

Japan-China Dental Conference 2012 プログラム・抄録集, 27, 2012.

Japan-China Dental Conference 2012 成都市、中国

東京歯科大学学生化学

研究課題番号: A04-0325-1

齋藤暁子 1)、落合宏美 1)3)、岡田晶子 1)2)、東俊文 1)2)3)

ES、iPS 細胞における未分化調節機構 Nodal-Lefty 系のヒト肝癌細胞における調節機構

再生医療, 11(増刊号), 223, 2012.

第 11 回日本再生医療学会総会 横浜市

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc7、3) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc8

研究課題番号: A04-0325-1

岡田晶子 1)、落合宏美 1)2)、齋藤暁子 1)、東俊文 1)2)

遷延する炎症における骨再生阻害因子 TGF- $\beta$ 1 の阻害機序の解明

J Oral Biosci, 54(Suppl), 163, 2012.

第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 郡山市

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学口腔科学研究センター

齋藤暁子 1)、落合宏美 1)3)、岡田晶子 1)2)、佐藤裕 1)2)、東俊文 1)2)3)

ES、iPS 細胞における未分化調節機構 Nodal-Lefty 系のヒト癌株化細胞における

調節機構

2012.

第 85 回日本生化学会大会 福岡市

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc7、3) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc8

岡田晶子 1)、齋藤暁子 1)、落合宏美 1)2)、安孫子宣光 3)、東俊文 1)2)

新たな骨分化メカニズムの解明 ( PI3 kinase 活性化機序との関連 )

2012.

第 85 回日本生化学会大会 福岡市

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc8、3) 日本大学松戸歯学部生化学・分子生物学

落合宏美 1)2)、加藤宏 3)、林宰央 3)、岡田晶子 2)、齋藤暁子 2)、佐藤裕 2)、東俊文 1)2)

ヒト iPS 細胞の骨分化誘導条件の検討

2012.

第 85 回日本生化学会大会 福岡市

1) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc8、2) 東京歯科大学学生化学、3) 東京歯科大学口腔外科学

落合宏美 1)2)、加藤宏 3)、林宰央 3)、岡田晶子 2)、齋藤暁子 2)、佐藤裕 2)、東俊文 1)2)

ヒト iPS 細胞の骨分化誘導条件の検討

2012.

第 85 回日本生化学会大会 福岡市

1) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc8、2) 東京歯科大学学生化学、3) 東京歯科大学口腔外科学

岡田晶子 1)、落合宏美 1)2)、齋藤暁子 1)、安孫子宣光 3)、東俊文 1)2)

新たな骨分化メカニズムの解明 ( PI3

kinase 及び WNT 活性化機序との関連 )

第 1 2 回日本再生医療学会総会プログラム抄録集, 12, 248, 2013.

第 1 2 回日本再生医療学会総会 横浜市

1)東京歯科大学学生化学講座、2)東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc8、3)日本大学松戸歯学部生化学・分子生物学

齋藤暁子、落合宏美、岡田晶子、東俊文  
ES、iPS 細胞における未分化調節機構 Nodal-Lefty 系のヒト癌株化細胞における調節機構

第 1 2 回日本再生医療学会総会プログラム抄録集, 12, 289, 2013.

第 1 2 回日本再生医療学会総会 横浜市

東京歯科大学学生化学講座

齋藤暁子、篠宏美、小野寺晶子、東俊文  
ヒト iPS 細胞の EB 形成時における ALP 発現の動態に関する検討

第 86 回日本生化学会大会 横浜市

東京歯科大学学生化学

落合 - 篠宏美 1)、加藤宏 2)、齋藤暁子 1)、小野寺晶子 1)、佐藤裕 1)、東俊文 1)

ヒト iPS 細胞から骨細胞への効果的な誘導  
第 86 回日本生化学会大会 横浜市

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学口腔外科学

佐藤裕 1)、柴山和子 2)、東俊文 1)3)

マルトオリゴ糖の分解に関与する *S. mutans malQ* 遺伝子の特徴付け

第 55 回歯科基礎医学会 岡山市

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学微生物学、3) 東京歯科大学口腔科学研究センター・hrc8

小野寺 晶子 1)、月野和 隆 2)、篠 宏美 1)、齋藤 暁子 1)、東 俊文 1)

BMP/SMAD 経路を介したデキサメタゾンの  
WNT 阻害因子への関与

第 36 回日本分子生物学会年会 神戸市

1) 東京歯科大学学生化学、2) 東京歯科大学  
歯科保存学

加藤宏、篠宏美、小野寺晶子、齋藤暁子、  
林宰央、長谷川 大悟、柴原孝彦、東俊文  
iPS 細胞から誘導した骨芽細胞を用いた創  
薬評価

第 68 回日本口腔科学会学術集会、2014 年 5  
月、東京都

Suzuki E, Ochiai-Shino H, Aoki H, Hayashi  
T, Takahashi J, Azuma T, Saito A

TGF- $\beta$ 1 regulates osteoblast  
differentiation via PI3K/Akt signaling  
pathway

The 57th Spring Meeting of the Japanese  
Society of Periodontology, May 2014,  
Gifu

鈴木瑛一、落合(篠)宏美、青木栄人、小野  
寺晶子、齋藤暁子、齋藤淳、東俊文

TGF- $\beta$ 1 によるマウス前骨芽細胞の分化調  
節における PI3K/Akt シグナル伝達経路の  
役割

第 297 回東京歯科大学学会、2014 年 6 月、  
東京都

月野和隆、小野寺晶子、吉澤佑世、篠宏美、  
齋藤暁子、間奈津子、東俊文、村松敬、古  
澤成博

BMP-Wnt 間のクロストークに対する  
Dexamethasone の影響

日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会  
(第 140 回)、2014 年 6 月、大津市

東俊文、齋藤暁子、小野寺晶子、加藤宏、  
篠宏美

iPS 細胞から骨前駆細胞分化誘導および単  
離の新規方法開発と骨細胞様細胞への分化  
誘導

第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7  
月、大阪市

加藤宏、篠宏美、小野寺晶子、齋藤暁子、  
林宰央、長谷川大悟、柴原孝彦、東俊文  
iPS 細胞から誘導した骨芽細胞を用いた創  
薬評価-活性型ビタミン D<sub>3</sub> の効果判定-

第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7  
月、大阪市

林宰央、恩田健志、長谷川大悟、加藤宏、  
篠宏美、横山暁子、小野寺晶子、須賀賢一  
郎、大畠仁、柴原孝彦、東俊文

骨再生における自己組織化ナノペプチドハ  
イドロゲルの応用

第 27 回日本顎関節学会総会・学術大会、  
2014 年 7 月、福岡市

佐藤裕、東俊文

*Streptococcus mutans* におけるマルトース  
代謝の解析

第 56 回歯科基礎医学会、2014 年 9 月、福  
岡市

Suzuki E, Ochiai-Shino H, Aoki H, Onodera  
S, Saito A, Azuma T, Saito A

Akt activation reverses inhibitory  
effects of TGF- $\beta$ 1 on preosteoblast  
MC3T3-E1 cell differentiation

American Academy of Periodontology 100th  
Annual Meeting, Sept. 2014, San  
Francisco

林宰央、恩田健志、長谷川大悟、加藤宏、  
篠宏美、横山暁子、小野寺晶子、高野伸夫、  
柴原孝彦、東俊文

ヒト iPS 細胞を用いた骨再生療法に関する

基礎的研究

第 59 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会、2014 年 10 月、千葉市

Suzuki E, Ochiai-Shino H, Aoki H, Onodera S, Saito A, Azuma T, Saito A

Akt is a Key Modulator in TGF-β1-Induced Osteoblast Differentiation

The 62nd Annual, Meeting of Japanese Association for Dental Research, Dec. 2014, Osaka

小野寺晶子、長谷川大悟、齋藤暁子、大高真奈美、渡邊章、西村健、柴原孝彦、片倉朗、中西真人、東俊文

基底細胞母斑症候群 ( Gorlin 症候群 ) 患者由来細胞を用いた疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞 ( iPS 細胞 ) の樹立

第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月、横浜市

齋藤暁子、小野寺晶子、大木章生、長谷川大悟、大高真奈美、中西真人、西村健、渡邊章、柴原孝彦、末石研二、東俊文

鎖骨頭蓋骨異形成症患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立

第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月、横浜市

長谷川大悟、小野寺晶子、齋藤暁子、大高真奈美、渡邊章、西村健、東俊文、片倉朗、中西真人、柴原孝彦

基底細胞癌発生機序解明を目指した Gorlin 症候群患者由来ヒト人工幹細胞 ( iPS 細胞 ) の樹立

第 24 回日本有病者医療学会総会・学術大会、2015 年 3 月、旭川市

〔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 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  
東 俊文 ( AZUMA Toshifumi )  
東京歯科大学・歯科学部・教授  
研究者番号：00222612

(2) 研究分担者  
篠 宏美 ( SHINO Hiromi )  
東京歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：00445446

小野寺晶子 ( ONODERA Shoko )  
東京歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：00637662

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：