

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463064

研究課題名(和文)インプラント治療におけるiPS細胞を用いた再生骨の長期安全性に関する研究

研究課題名(英文)Long-term stability of bone regenerated by iPS cells in dental implant treatment

研究代表者

城戸 寛史(Kido, Hirofumi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：90169897

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)：効率的なiPS細胞の分化誘導と骨再生療法への応用を目的に、AutophagyによるiPS細胞の分化誘導への影響を検証した。iPS細胞(iPS-MEF-Ng-20D-17)を用いた。Autophagy阻害剤である3-Methyladenine(3MA)にてclass -PI3K複合体を阻害し、Autophagyの影響を検討した。その結果、Autophagy阻害によってiPS細胞は未分化を維持する傾向にあり、骨分化誘導の抑制する傾向にあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether autophagy regulate an induction of osteogenesis in mouse iPS cells. Mouse iPS cells (iPS-MED-Ng-20D-17) were used in this study and cultured in the basal medium with leukemia inhibitory factor (LIF). To examine an effect of autophagy to maintain undifferentiated state of iPS cells, the cells were cultured in complete medium with 3-methyladenin (3-MA), autophagy inhibitor. In the results of this study, autophagy up-regulates the early differentiation in iPS cells. In contrast, autophagy suppresses the osteogenic differentiation in them.

研究分野：歯科インプラント

キーワード：iPS細胞 再生骨 インプラント 安定性

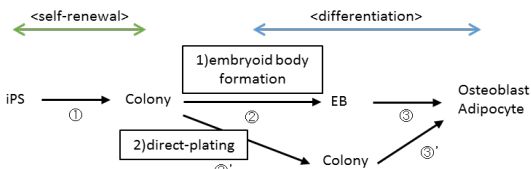
1. 研究開始当初の背景

人工多能性細胞 (iPS 細胞) はヒトの細胞からの樹立が報告されており、再生医療の実現に向けて期待が高まっている。最近の報告ではヒトの歯肉の細胞から iPS 細胞の作製が報告され、歯科分野への応用が期待されている。しかし、実際に iPS 細胞をヒトに応用するためには安全性の確立が必須である。

再生医療には、細胞、成長・増殖因子、足場の3つの因子が必要である。現在のところ、細胞の因子として間葉系幹細胞 (MSC)、胚性幹細胞 (ES 細胞) などが臨床応用に向けて研究されている。しかしながら、細胞の採取部位が限られること、受精卵を用いるなどの倫理的問題から、これらの細胞を利用することは一定の制限があると考えられる。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、様々な部位より細胞を獲得しやすく、かつ、自己複製能・多分化能を有することが知られている。iPS 細胞を目的の細胞に分化させるためには、まず iPS 細胞を間葉系細胞に誘導し、その後分化誘導を行う2つのステップが必要である。培養方法としては、胚葉体 (EB) 形成を介する方法 (embryoid body formation) と EB 形成を介さない方法 (direct planting) がある。

2. 研究の目的

チタン製歯科インプラントは、すでに歯の欠損補綴治療の重要な選択肢として広く臨床に取り入れられている<sup>1,2)</sup>。しかし顎骨の萎縮した症例では解剖学的制約によって理想的な応用が困難である。骨移植や骨誘導再生法などの骨の再生治療が臨床に取り入れられているが効果は限定的である。人工多能性細胞 (iPS 細胞) は分化万能性と自己複製能を有しているため効果的な再生医療の実現において注目されているが、安全性の確保は重要な課題である。そこで本研究では iPS 細胞による骨再生治療の安全性を確保するため、iPS 細胞から骨芽細胞への安全で安定した分化誘導方法について検討した。



細胞の恒常性維持のメカニズムの一つとして、Autophagy があることが知られており、自己複製能・分化誘導に与する可能性が推測されている。本研究では、3-Methyladenine (3MA) を用いて class -PI3K complex を阻害することにより、上記 ( ) における Autophagy の影響を検証した。

3. 研究の方法

3MA 非添加 (Control 群) および添加群 (3MA 群) において、それぞれ、グループ (通常培地で培養したもの)、グループ (骨分化誘導培地 (Ascorbic Acid, Hydrocortisone, -Glycerophosphate) にて骨分化誘導を行ったもの) を作製した。評価方法として、グループ では、Western blotting 法 (WB; Nanog, LC3)、細胞免疫染色 (ICC; Nanog)、ALP 染色、グループ では、Real time RT-PCR (qRT-PCR; ALP, Runx2, Osterix)、ICC (Osterix) にて評価を行った。

4. 研究成果

グループ : 通常培養  
ALP 染色にて、Control 群と比較して、3MA 群の方がコロニー形態を保ち、ALP 陽性細胞が多く見られる傾向にあり (図 1)。WB 法では、3MA 群において LC3- の発現が減少したのに対し、Nanog の発現が増加した。(図 2) また、ICC では、Nanog 陽性細胞が多く見られる傾向にあった。(図 3) 以上より Autophagy を抑制することで、マウス iPS 細胞は、未分化を維持する傾向にあることが示唆された。

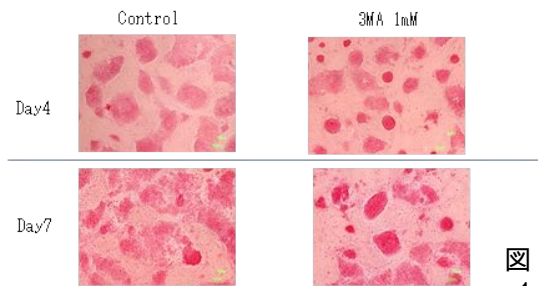


図 1 培養 4,7 日目における ALP 染色像 Control 群と比較して、3MA 群の方がコロニー形態を保ち、ALP 陽性細胞が多く見られる。

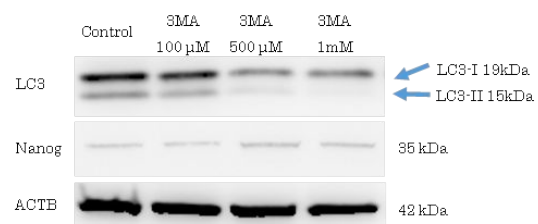


図 2 培養 7 日目における Western blotting 法の結果 Control 群と比較して、3MA 群の方が Nanog の発現が増加した。

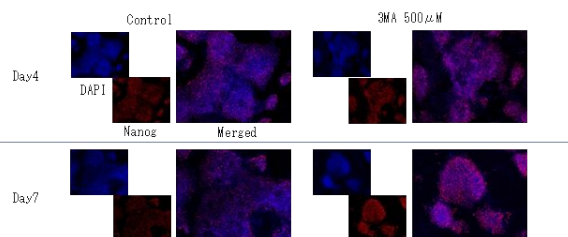


図 3 培養 4, 7 日目における細胞免疫染色像 (Nanog) Control 群と比較して、3MA 群の方が Nanog 陽性細胞が多く見られる。

## グループ：骨分化誘導

qRT-PCRにて、Control群と比較して3MA群の方がRunx2、Osterixの増加を認めた。(図4)また、ICCにて3MA群の方が、Osterix陽性細胞が多く見られる傾向にあった。(図5)以上より、Autophagyを抑制することで、マウスiPS細胞は、骨分化誘導を促進する傾向にあることが示唆された。

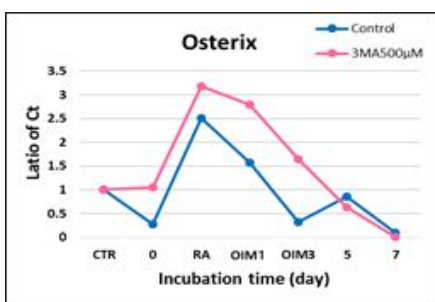
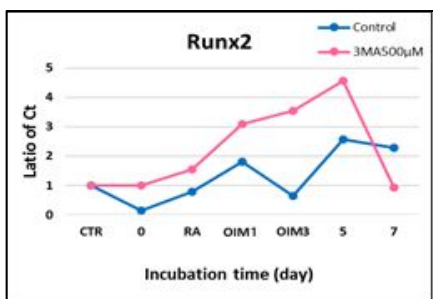


図4 Real time RT-PCRの結果 Control群と比較して3MA群の方がRunx2、Osterixの増加を示した。

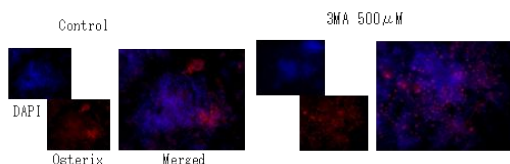


図5 骨分化誘導2週における細胞免疫染色像(Osterix) Control群と比較して、3MA群の方がOsterix陽性細胞が多く見られる。

## 結論

AutophagyはiPS細胞の性状維持に関与することが示唆された。3MAを用いてAutophagyを抑制すると、通常培養下では、未分化を維持する傾向にあり、骨分化誘導下では、骨分化誘導を促進する傾向にあることが示唆された。

AutophagyによるiPS細胞の骨系細胞への分化と維持は骨再生治療の安全性に寄与することが示唆された。

## 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1件)

Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. BMC Biotechnol. 2014 Dec 6;14(1):105

## 〔学会発表〕(計4件)

Yuichiro Yamaguchi, Jun Ohno, Ayako Sato, Ayako Matsumoto, Naoyuki Miyaguchi, Hirofumi Kido, Tadao Fukushima Effects of bone regeneration on mesenchymal stem cells in spheroid culture AAO (札幌), 7/4-5, 2014.

佐藤 絢子, 大野 純, 柳 束, 山口 雄一郎, 城戸 寛史, 福島 忠男  
マウスiPS細胞におけるAutophagyによる骨分化誘導への影響  
第36回バイオマテリアル学会, 2014年11月

佐藤 絢子, 大野 純, 山口 雄一郎, 宮口 直之, 城戸 寛史, 福島 忠男  
マウスiPS細胞の骨分化誘導へのAutophagyの影響  
第41回福岡歯科大学学会総会, 2014年12月

Ayako Sato, Naoyuki Miyaguchi, Kanae Yasumatsu, Hironobu Sato, Jun Ohno, Hirofumi Kido  
Effect of autophagy to induce osteogenic differentiation in mouse iPS cells  
EAO congress(Paris), 9/29-10/1, 2016.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

城戸 寛史 (KIDO, Hirofumi)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  
研究者番号: 90169897

### (2) 研究分担者

茂野 啓示 (SHIGENO, Keiji)  
京都大学・再生医科学研究所・講師  
研究者番号: 00162587

寺岡 啓 (TERAOKA, Kay)  
独立行政法人産業技術総合研究所・機能化学研究部門・主任研究員  
研究者番号: 00357542

森永 健三 (MORINAGA, Kenzo)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師  
研究者番号: 10509061

山本 勝己 (YAMAMOTO, Katsuki)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師  
研究者番号: 70425312

園田 勉 (SONODA, Tsutomu)

独立行政法人産業技術総合研究所・構造材  
料研究部門・主任研究員  
研究者番号：8 0 3 5 7 3 3 4

渡津 章(WATAZU, Akira)  
独立行政法人産業技術総合研究所・構造材  
料研究部門・主任研究員  
研究者番号：9 0 3 5 8 3 7 5