

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670835

研究課題名(和文) iPS細胞を原材料とするバイオミメティック骨再生剤の開発

研究課題名(英文) Fabrication of bone graft materials using iPS cells

研究代表者

江草 宏 (Egusa, Hiroshi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30379078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞が有する“無限の増殖能”および“骨基質の産生能”という性質に着目し、iPS細胞を骨補填材として用いる技術を着想した。マウス歯肉由来iPS細胞の胚様体を用い、骨芽細胞様のiPS細胞凝集体の作製を試みた結果、浮遊培養法を用いることで大きさや骨基質成分の含有量を制御可能であることを見出した。また、不活化した骨芽細胞様のマウス歯肉由来iPS細胞凝集体は、骨補填材として良好な特徴を示すことが動物実験で明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：iPS cells can be infinitely expanded and guided to differentiate into osteogenic cells. In this research project, we attempted to fabricate bone graft materials by inactivation of osteogenically-induced iPS cells. Embryoid bodies of mouse gingiva-derived iPS cells were used to fabricate osteogenic iPS cell constructs. We found that the size and calcium production of mouse gingiva-derived iPS cell constructs can be controlled under a floating culture condition to provide suitable characteristics as a bone grafting material that enables bone regeneration in an animal model.

研究分野：再生歯学

キーワード：骨補填材 iPS細胞 再生歯学

### 1. 研究開始当初の背景

補綴歯科治療において、顎堤吸収により失われた骨の欠損部を補うための骨補填材料の需要は高まる一方である。現在、臨床に使用されている骨補填材には、化学的に合成されたリン酸カルシウム材料あるいはウシ由来の脱蛋白質乾燥骨等がある。しかしながら、これらの生体材料は、自家骨に比べて骨再生能が劣る上、術後吸収による再生骨量の減少等の問題があり、治療の予後は必ずしも良好ではない。また、動物由来の生体材料には未知の感染性因子が存在する可能性が完全には否定できないため、これらに代わる新たな骨補填材料の開発が望まれている。

申請者は、歯肉から iPS 細胞を作製し、この技術の医療応用に向けて研究を進めている。また、予備実験にて iPS 細胞を骨芽細胞へ分化誘導すると、豊富な石灰化物を産生するという知見を得た。これらを背景に申請者は、iPS 細胞を用いて骨再生に有効な成分を大量に生成し、その後不活化したバイオミメティックな生成物を骨再生剤に資する技術を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、患者自身の細胞に由来する自家骨成分に近い「バイオミメティック骨再生剤」の開発である。

### 3. 研究の方法

- (1) iPS 細胞の骨芽細胞凝集体への分化誘導  
マウス歯肉由来 iPS 細胞から誘導した胚様体を、静置培養あるいは浮遊培養しながら骨芽細胞分化誘導培地中で培養した。
- (2) iPS 細胞由来骨芽細胞凝集体の解析  
得られた iPS 細胞凝集体の大きさおよび乾燥質量を測定し、骨芽細胞特異的遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。  
また、培養上清中に抽出された BMP-2 (骨形成蛋白質) を ELISA 法により定量した。  
細胞が産生したカルシウム量を MXB 法で定量し、iPS 細胞凝集体の成分をフーリエ変換型赤外分光 (FT-IR) で解析した。
- (3) iPS 細胞由来骨補填剤の解析  
マウス歯肉由来 iPS 細胞の胚様体を上記と同様の方法で培養し、得られた iPS 細胞凝集体を不活化することにより iPS 細胞由来骨補填製材を作製した。  
iPS 細胞由来骨補填製材の含有成分が、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) の石灰化に及ぼす影響を Alizarin Red 染色により評価した。  
また、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、iPS 細胞由来骨補填製材の表面形態を観察した。
- (4) iPS 細胞由来骨補填剤の骨再生効果の検

### 討

iPS 細胞由来骨補填製材をラット頭蓋骨に形成した直径 5 mm の欠損部に填入し、10 週間後の骨組織再生をマイクロ CT 画像解析および組織切片観察 (HE 染色) により評価した。

### 4. 研究成果

- (1) iPS 細胞の骨芽細胞凝集体への分化誘導  
マウス歯肉由来 iPS 細胞を浮遊培養しながら骨芽細胞へ分化誘導した結果、三次元的な iPS 細胞の凝集体を得ることが可能であった。
- (2) iPS 細胞由来骨芽細胞凝集体の解析  
iPS 細胞を浮遊培養下で骨芽細胞へ分化誘導した結果、iPS 細胞凝集体の大きさと乾燥質量は、静置培養した場合と比較して有意に増加した。  
浮遊培養下で骨芽細胞へ分化誘導した iPS 細胞胚様体は、静置培養した場合と比較して骨芽細胞特異的遺伝子の発現を経時的に促進した。  
ELISA 解析の結果、iPS 細胞を浮遊培養下で骨芽細胞へ分化誘導した場合には、培養上清中に分泌された BMP-2 量は、静置培養した場合と比較して有意に増加した。  
また、浮遊培養下で骨芽細胞へ分化誘導した iPS 細胞凝集体が産生したカルシウム量は、静置培養した場合と比較して有意に増加した。FT-IR 解析の結果、浮遊培養した iPS 細胞凝集体は、骨組織に特異的な FT-IR の赤外線吸収スペクトルパターンを示した。
- (3) iPS 細胞由来骨補填剤の解析  
Alizarin Red 染色の結果、骨芽細胞へ分化誘導したマウス BMSCs の石灰化は、iPS 細胞由来骨補填材の含有成分を添加することで濃度依存的に促進された。  
SEM 観察の結果、iPS 細胞由来骨補填製材の表層や内部には多くの間隙を認められた。
- (4) iPS 細胞由来骨補填剤の骨再生効果  
ラット頭蓋骨欠損に不活化した iPS 細胞由来骨補填材を填入した結果、欠損部には iPS 細胞由来骨補填製材を取り囲む新生骨の形成を認め、皮質骨様の骨組織再生が観察された。また、術後 10 週間にわたり、いずれの組織切片においても腫瘍化を示す所見は認めなかった。マイクロ CT 画像解析の結果、iPS 細胞由来骨補填製材を填入した骨欠損部の骨密度は、経時的に増加し、術後 10 週間でラット頭蓋骨の骨密度と同等の値を示した。

以上の結果から、iPS 細胞を浮遊培養下で骨芽細胞へ分化誘導することで、骨組織に近い成分を有する細胞凝集体を得られることが示された。また、これを不活化した材料は、

骨補填材として有用である可能性が示唆された。

#### 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 4件)

Matsumoto T, Egusa H, Kato K, Tsuji T: Biodental engineering. J Oral Biosci, 57(2): 80-85, 2015. (査読有)

doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2015.01.002

Egusa H: Increasing diversity in prosthodontic research. J Prosthodont Res, 58(4): 191-192, 2014. (査読有)

doi: 10.1016/j.jpor.2014.08.002

Egusa H, Kayashima H, Miura J, Uraguchi S, Wang F, Okawa H, Sasaki J-I, Saeki M, Matsumoto T, Yatani H: Comparative analysis of mouse induced pluripotent stem cells and mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation in vitro. Stem Cells Dev, 23(18): 2156-2169, 2014. (査読有)

doi:10.1089/scd.2013.0344

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: 33: 54-58: 2014. (査読無)

http://www.jads.jp/jjads\_j/jjads\_j\_33.pdf

##### [学会発表](計 22件)

江草 宏: iPS 細胞を用いた骨再生医療戦略, 第 70 回 東京工業大学精密工学研究所シンポジウム シンポジウム「精密工学の新たな展開 - 医歯工連携から社会実装へ - 」, 2016 年 3 月 11 日 (横浜市).

江草 宏: iPS cell-based strategies in bone tissue engineering, The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science 国際シンポジウム “Regenerative Oral Science”, 2016 年 1 月 19 日 (仙台市)

江草 宏: iPS cells: What they are and what they can contribute to the field of dentistry, Chulalongkorn-Tohoku Joint Symposium in Dental Science 2015, 2015 年 12 月 9 日 (Bangkok, Thailand).

江草 宏: iPS cells and their expected role in the future of dentistry, The 3rd Sino-Japan Dental Science Symposium, 2015 年 11 月 24 日 (Fujian, 中国).

江草 宏: iPS 細胞技術が描く歯科医療の未来, 平成 27 年度 日本補綴歯科学会

東北・北海道支部学術大会 特別講演, 2015 年 10 月 25 日 (盛岡市).

江草 宏: iPS cells: What they are and what they can contribute to the field of dentistry, Hong Kong University - Tohoku University 1st Bilateral Dental Symposium, 2015 年 10 月 16 日 (香港, 中国).

江草 宏: iPS 細胞を用いた骨再生研究とインプラント臨床への展望, 第 45 回 日本口腔インプラント学会学術大会シンポジウム「口腔インプラント治療や歯科治療は, 生物学の進歩によってどう変わるか」, 2015 年 9 月 22 日 (岡山市) 山本治毅, 菅島浩輝, 裏口真也, 矢谷博文, 江草 宏: iPS 細胞由来骨基質を利用した生体模倣骨補填材料の開発, 日本口腔インプラント学会, 2015 年 9 月 22 日 (岡山市).

江草 宏: iPS cells and their expected role in the future of prosthodontics, 16th Biennial Meeting of International College of Prosthodontists, 2015 年 9 月 18 日 (Seoul, 韓国).

江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 日本臨床歯周病学会第 33 回年次大会 教育講演, 2015 年 7 月 18 日 (仙台市).

江草 宏: iPS cells: What they are and what they can contribute to the field of dentistry, Sichuan-Tohoku Dental Symposium 2015, 2015 年 7 月 10 日 (Sichuan, 中国).

江草 宏: iPS 細胞を用いた骨組織再生, 日本組織培養学会第 88 回大会 シンポジウム「臨床のため細胞培養」, 2015 年 5 月 27 日 (広島市).

江草 宏: 歯科領域における再生医療の動向と展望, 第 69 回 日本口腔科学会学術集会 教育研修会講演 シンポジウム「再生医療の最前線」, 2015 年 5 月 13 日 (大阪府).

江草 宏: iPS cells: What they are and what they can contribute to prosthodontics, 2015 Biennial Joint Congress of JPS-CPS-KAP 国際シンポジウム “The Latest Progress of Dental Science”, 2015 年 4 月 11 日 (箱根).

江草 宏: Application of iPS Cells in Bone Biology, China-Japan-Korea Dental Science Symposium 2014 国際シンポジウム “Biologic Contribution in The Prosthodontic Research”, 2014 年 11 月 8 日 (Dalian, 中国).

江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 第 73 回 日本矯正歯科学会学術大会 特別講演, 2014 年 10 月 21 日 (千葉市).

江草 宏: iPS 細胞の骨生物学への応用

と歯科臨床への展望,平成 26 年度 日本  
歯科理工学会 北海道・東北地方会夏季  
セミナー 特別講演,2014年8月2日(仙  
台市).

Yamamoto H, Okawa H, Yatani H, Egusa  
H: Fabrication of biomimetic bone  
graft materials using iPS cells, 92th  
IADR General Session, 2014 年 6 月 27  
日 (Cape Town, South Africa).

江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医  
療とは,第 65 回 東北大学歯学会 特別  
講演,2014 年 6 月 13 日(仙台市).

江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医  
療とは,昭和大学 学士会後援セミナー,  
2014 年 5 月 19 日(東京).

②① 江草 宏: iPS 細胞の骨形成能と歯科臨  
床への展望,第 68 回 日本口腔科学会学  
術集会 シンポジウム「iPS 細胞が拓く  
未来の医療」2014 年 5 月 9 日(東京都).

②② 江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医  
療とは,第 47 回 新潟歯学会総会 特別  
講演,2014 年 4 月 19 日(新潟市).

#### 〔図書〕(計 3 件)

江草 宏: 未永書店,再生医療の固定性  
補綴治療への展開(冠橋義歯補綴学テキ  
スト),2015,280(213-219).

江草 宏: 医歯薬出版,幹細胞と再生歯  
科医療(口腔組織学・発生学 第 2 版),  
2015,384(125-130).

Yu G, Kamano Y, Wang F, Okawa H, Yatani  
H, Egusa H: Springer, Feeder cell  
sources and feeder-free methods for  
human iPS cell culture(Interface Oral  
health Science 2014), 2015, 351  
(145-159).

#### 〔その他〕

##### 学術賞受賞

山本治毅: 優秀ポスター賞(デンツブラ  
イ賞),日本口腔インプラント学会・学  
術学会(演題:iPS 細胞由来骨基質を利用  
した生体模倣骨補填材料の開発),  
2015 年 9 月 22 日.

山本治毅: 1st Place Winner, IADR  
Pre-Prosthetic Regenerative Science  
Award(演題:Fabrication of biomimetic  
bone graft materials using iPS cells),  
2014 年 6 月 27 日.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

江草 宏(EGUSA, Hiroshi)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号:30379078

##### (2)研究分担者

該当なし

##### (3)連携研究者

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

福本 敏(FUKUMOTO Satoshi)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号:30264253