

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04385

研究課題名（和文）iPS由来神経堤細胞によるバイオミメティクスに基づいた新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of the new periodontal ligament regeneration method based on iPS-derived neural crest cells

研究代表者

友清 淳（Tomokiyo, Atsushi）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20507777

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らは、Microarray解析の結果から、iPS-NCからiPS-PDLSCへの分化に伴い、CD44の発現量が増加することを明らかにした。CD44はヒアルロン酸(HA)のレセプターであることから、HAがiPS-NCからiPS-PDLSCへの分化誘導に重要であると考えた。そこで、低分子のHA存在下にて、ヒト神経堤細胞株を培養したところ、HA非存在下で培養したものと比較し、歯根膜細胞関連遺伝子であるCOL-1, FBN1, OPG, およびPOSTNの発現量が上昇した。この結果から、HAはiPS-NCのiPS-PDLSCへの誘導を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在用いられている歯周組織再生療法は、タンパク製剤を用いる方法であり、組織再生に必要な3要素のうち、シグナル因子のみを活用する方法である。申請者らが開発を目指す歯周組織再生療法は、iPS細胞由来神経堤細胞(iPS-NC)および低分子量ヒアルロン酸(LHA)を用いて、歯周組織の発生模倣を基盤とし、歯周組織再生を実現させようとするものである。LHAの働きにより、神経堤細胞様細胞が歯根膜幹細胞様細胞へと分化誘導されることが明らかとなった。この成果は、iPS-NCをLHAを基盤とする足場材と共に移植する方法が、新たな歯周組織再生療法となりうる可能性を示唆しており、非常に意義の高いものである。

研究成果の概要（英文）：Our microarray analysis demonstrated that CD44 expression was up-regulated during iPS-PDLSC differentiation. CD44 is known as a kind of HA receptor, therefore we hypothesized that HA should play important roles in the differentiation of iPS-NC into iPS-PDLSC. A human NC cell line cultured with HA increased PDLSC-related genes, such as COL-1, FBN1, OPG, and POSTN, compared with cells cultured without HA. Our result suggested that HA would promote the differentiation of iPS-NC into iPS-PDLSC.

研究分野：歯周組織再生医療

キーワード：生体模倣 歯根膜幹細胞 神経堤細胞 iPS細胞 低分子量ヒアルロン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯は歯槽骨、セメント質、歯肉および歯根膜組織 (PDL) で構成される歯周組織によって支持されている。歯周病による歯周組織の破壊は歯の動揺や疼痛を引き起こし、重度の場合には抜歯が選択されることから、歯周病は長きに渡り日本人の抜歯原因の一位である。したがって、歯周病により破壊された歯周組織の再生は、残存歯数の増加による審美性および咀嚼機能の維持を介して、歯周病患者の QOL 向上へ繋がることが予想される。組織の再生には生体の発生を模倣する、いわゆる biomimetics が有効であるとされているが、歯周組織の発生を模倣することで、その再生を誘導するという試みは行われていなかった。

2. 研究の目的

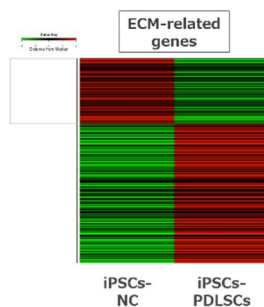
歯周組織の発生には、神経堤細胞 (NC) が重要な役割を果たすが、組織に存在する NC の数は極めて少なく、分取することは難しい。申請者は、人工多能性幹細胞 (iPS) に着目し、神経堤細胞に類似した表現型を示す神経堤細胞様細胞 (iPS-NC) を樹立した。本研究では、この iPS-NC を応用し、歯周組織の発生過程を模倣させることで、歯周組織の再生を誘導するという新しいコンセプトの歯周組織再生療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

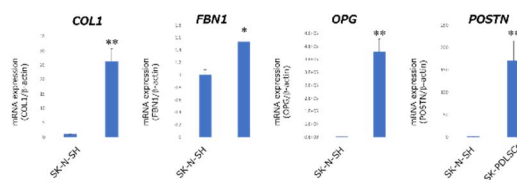
組織の再生には、幹細胞が重要な役割を担うが、歯周組織の再生においては、歯根膜幹細胞 (PDLSC) が重要であることが報告されている。申請者は、iPS-NC から iPS 由来歯根膜幹細胞様細胞 (iPS-PDLSC) を樹立する方法を確立した (Hamano et al. 2018)。そこで本研究では、iPS-NC および iPS-PDLSC を用いて、iPS-NC が iPS-PDLSC へ分化する過程で発現上昇する遺伝子群について検索を行い、iPS-PDLSC への分化に重要と考えられる因子について検索を行った。この結果を基に、iPS-NC を生体へ移植する際に、生体模倣に有効と考えられる足場材の選定を行った。

4. 研究成果

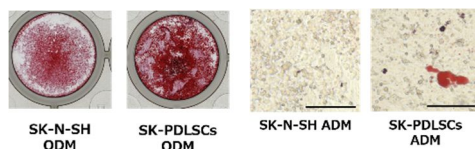
iPS-NC および iPS-PDLSC を用いたマイクロアレイ解析およびパスウェイ解析の結果から、iPS-NC が iPS-PDLSC へと分化する際に、細胞外基質関連遺伝子群が数多く常用することが明らかとなった(下図)。



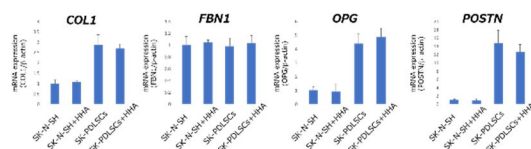
その中に、ヒアルロンの受容体である CD44、およびヒアルロン酸関連遺伝子群が含まれることが明らかとなった。ヒアルロン酸には低分子量から高分子量のものまで、分子量の異なるものが存在する。そこで、分子量の異なるヒアルロン酸が神経堤細胞から歯根膜幹細胞の分化誘導に及ぼす影響について検索することとした。一方で、iPS 細胞から iPS-NC への分化誘導には、時間もコストも必要となる。そこで申請者は、新たな実験モデルを作製するため、ヒト神経堤細胞株 (SK-N-SH) に着目した。SK-N-SH は既に神経堤細胞としての表現型を持つため、神経堤細胞への分化誘導を必要とせず、さらに不死化しているため、高い増殖力を示す。この細胞を iPS-NC と同様に、歯根膜幹細胞へと分化誘導したところ、iPS-NC と同様に歯根膜幹細胞マーカーの発現上昇を認めた(下図)。



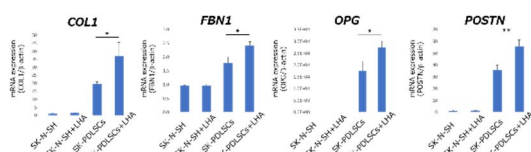
また、SK-N-SH を歯根膜幹細胞へと分化誘導した SK-PDLSCs は、誘導前の細胞と比較して、高い間葉系細胞（骨芽細胞および脂肪細胞）への分化能を示した(下図)。



これらの結果から、SK-N-SH を応用した歯根膜幹細胞分化誘導モデルは、iPS 細胞を用いたモデルと類似した実験結果が得られることが示唆された。SK-N-SH を高分子量のヒアルロン酸 (HHA) 存在下にて、SK-PDLSCs への分化誘導を行ったところ、分化促進効果は認められなかった (下図)。



一方、LHA 存在下にて、SK-PDLSCs への分化誘導を行ったところ、非存在下と比較し、分化が促進された (下図)。



これらの結果から、LHA は神経堤細胞の歯根膜幹細胞分化を促進する作用を有することが明らかとなり、LHA は iPS-NC を歯周組織欠損部位へ移植する際に、有効な足場材となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujino Shoko, Hamano Sayuri, Tomokiyo Atsushi, Itoyama Tomohiro, Hasegawa Daigaku, Sugii Hideki, Yoshida Shinichiro, Washio Ayako, Nozu Aoi, Ono Taiga, Wada Naohisa, Kitamura Chiaki, Maeda Hidefumi	4. 巻 235
2. 論文標題 Expression and function of dopamine in odontoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 4376 ~ 4387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomokiyo Atsushi, Wada Naohisa, Maeda Hidefumi	4. 巻 28
2. 論文標題 Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 974 ~ 985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2019.0031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Arima Mai, Hasegawa Daigaku, Yoshida Shinichiro, Mitarai Hiromi, Tomokiyo Atsushi, Hamano Sayuri, Sugii Hideki, Wada Naohisa, Maeda Hidefumi	4. 巻 54
2. 論文標題 R-spondin 2 promotes osteoblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells through the Wnt/ -catenin signaling pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 143 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomokiyo A, Yoshida S, Hamano S, Hasegawa D, Sugii H, Maeda H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Detection, Characterization, and Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Ligament Tissue.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells Int.	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5450768.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arima M, Hasegawa D, Yoshida S, Mitarai H, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Wada N, Maeda H.	4. 巻 54
2. 論文標題 R-spondin 2 promotes osteoblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells through the Wnt/ -catenin signaling pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Periodontal Res.	6. 最初と最後の頁 143-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12611.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamano Sayuri, Tomokiyo Atsushi, Hasegawa Daigaku, Yoshida Shinichiro, Sugii Hideki, Mitarai Hiromi, Fujino Shoko, Wada Naohisa, Maeda Hidefumi	4. 巻 27
2. 論文標題 Extracellular Matrix from Periodontal Ligament Cells Could Induce the Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells to Periodontal Ligament Stem Cell-Like Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 100 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomokiyo Atsushi, Hynes Kim, Ng Jia, Menicanin Danijela, Camp Esther, Arthur Agnes, Gronthos Stan, Mark Bartold Peter	4. 巻 232
2. 論文標題 Generation of Neural Crest-Like Cells From Human Periodontal Ligament Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 402 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.25437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 友清 淳	4. 巻 61
2. 論文標題 Aryl hydrocarbon receptor signalingの活性化がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 337 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.61.337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Aoi Nozu, Sayuri Hamano, Atsushi Tomokiyo, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Hiromi Mitarai, Keita Ipposhi, Naohisa Wada, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 Effects of TNF- α on Senescent human dental pulp cells.
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience&OBT Research Center Joint International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoko Fujino, Hamano Sayuri, Atsushi Tomokiyo, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Ayako Washio, Hiromi Mitarai, Naohisa Wada, Chiaki Kitamura, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 Effects of dopamine on odontoblastic differentiation through PKA signaling
3. 学会等名 The 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉井英樹、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、吉田晋一郎、Mhd Safwan Albougha、前田英史
2. 発表標題 Activin Aが有する二極性の細胞分化誘導能に関する分子機構の解明.
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 TOMOKIYO Atsushi, HAMANO Sayuri, HASEGAWA Daigaku, SUGII Hideki, YOSHIDA Shinichirou, MITARAI Hiromi, ARIMA Mai, NOZU Aoi, WADA Naohisa, MAEDA Hidefumi
2. 発表標題 Discoloration of White Mineral Trioxide Aggregate Immersed in Various Solutions
3. 学会等名 International Association of Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野太雅、友清淳、長谷川大学、濱野さゆり、吉田晋一郎、杉井英樹、有馬麻衣、野津葵、和田尚久、前田英史
2. 発表標題 ヒト歯根膜クローン細胞株およびハイドロキシアパタイト焼成体を用いた人工歯根作製についての検討
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野太雅、友清淳、長谷川大学、濱野さゆり、吉田晋一郎、杉井英樹、有馬麻衣、野津葵、和田尚久、前田英史
2. 発表標題 Basic fibroblast growth factorおよびephrinB2がヒト歯根膜細胞の増殖に及ぼす影響について
3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 一法師啓太、友清淳、長谷川大学、濱野さゆり、吉田晋一郎、杉井英樹、有馬麻衣、野津葵、和田尚久、前田英史
2. 発表標題 ヒト歯髓細胞の象牙芽細胞分化に及ぼすsFRP1の影響について
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱野さゆり、友清淳、長谷川大学、杉井英樹、吉田晋一郎、御手洗裕美、有馬麻衣、野津葵、藤野翔香、和田尚久、前田英史
2. 発表標題 iPS細胞由来の歯根膜幹細胞様細胞の樹立
3. 学会等名 第17回再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱野さゆり
2. 発表標題 iPS細胞由来の歯根膜幹細胞様細胞の樹立
3. 学会等名 OBT研究センター キックオフシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 大学、和田 尚久、有馬 麻衣、吉田 晋一郎、友清 淳、濱野 さゆり、御手洗 裕美、前田 英史.
2. 発表標題 Tenomodulinがヒト歯根膜細胞の機能維持に及ぼす影響について.
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会春季大会.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Sugii, A. Tomokiyo, S. Hamano, D. hasegawa, S. Yoshida, H. Mitarai, A. Nozu, M. Arima, T. Itoyama, T. Ono, S. Fujino, K. Ippoushi, N. Wada, H. Maeda.
2. 発表標題 Activin A reversely works on the osteoblastic differentiation in human pre-osteoblastic cells and periodontal ligament cells.
3. 学会等名 The 65th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research. (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 友清 淳	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 532-537
3. 書名 Precision Medicine.	

1. 著者名 友清 淳	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 1373-1377
3. 書名 BIO Clinica.	

1. 著者名 Tomokiyo A, Hamano S, Hasegawa D, Sugii H, Yoshida S, Maeda H.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Remedy publications	5. 総ページ数 1-2
3. 書名 J Dent Oral Biol	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前田 英史 (Maeda Hidefumi) (10284514)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	吉田 晋一郎 (Yoshida Shinichiro) (30778866)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	濱野 さゆり (Hamano Sayuri) (40757978)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 尚久 (Wada Naohisa) (60380466)	九州大学・大学病院・教授 (17102)	
研究分担者	杉井 英樹 (Sugii Hideki) (80802280)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	長谷川 大学 (Hasegawa Daigaku) (20757992)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関