

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月9日現在

機関番号：17301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390360
 研究課題名（和文） 歯髄・根尖性歯周組織疾患に対するヒト iPS 細胞を使った再生療法の開発
 研究課題名（英文） Development of regenerative medicine using human iPS cells For pulp and periapical pathoses
 研究代表者
 林 善彦（HAYASHI YOSHIHIKO）
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：20150477

研究成果の概要（和文）：4あるいは3転写因子導入群間で、iPS細胞の成長、分化あるいは骨芽細胞への誘導に関して有意差はなかった。低酸素下、マウス iPS 細胞の低酸素誘導因子（HIF）の機能を、形態および多能性転写因子の発現と関係して検討した。HIF-2 α ノックダウン群では、iPS 細胞のコロニーサイズが小さくなった。また、HIF-2 α および -3 α ノックダウン群では、対照群と比べて多能性転写因子の発現が有意に減少した。これらの結果から、HIF-2 α はマウス iPS 細胞の多能性維持に重要な働きをしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：There are no statistical differences in either the growth and differentiation of (induced pluripotent stem) iPS cells or the induction of iPS cells to osteoblasts between the four and three transcription factor groups cultured under hypoxia. Furthermore, the function of (hypoxia inducible factors) HIFs in murine iPS cells under hypoxia was investigated in relation to the morphology and expression of the transcription factors. The HIF-2 α knockdown group exhibited a decreased colony size in the iPS cells. The HIF-2 α or -3 α demonstrated a statistical significant decrease in the expression of the transcription factors compared to those observed in the control group. These results demonstrate that HIF-2 α among HIFs is the most influential candidate for the maintenance of the pluripotency of murine iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2013年度	0	0	0
2014年度	0	0	0
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1)7年前の成人体性細胞へリプログラミングの鍵となるいくつかの転写因子を導入することに寄って iPS 細胞となる発見は、2012年度のノーベル医学・生理学賞として結実し

た（京都大学山中教授）。iPS細胞の治療への応用へ向けて、導入効率、多能性の完全さ・保持に関する改善が行われている。

(2)これまで医療への生体材料としては、牛由

来のものであった。しかし、1986年に英国で狂牛病の発生、1995年にはヒトでの狂牛病の発生によって、医療への牛由来の臓器の利用が禁止されている。その後、人獣共通感染症の広がりも合わさり、哺乳類、鳥類以外の材量の開発・研究が世界的にも活発となっている。今回、特に魚由来のコラーゲンを足場材に使用することを前提にしている。

2. 研究の目的

平成21年度からマウスおよびヒト iPS 細胞が、理化学研究所セルバンクを窓口として、全国の研究者へ有償で供給できる体制が整った。そこで本研究では、以下の2点を目的としている。

(1)歯髄、根尖周囲病変による組織欠損のための真の細胞生物学的な治療法を確立することを目的に、iPS 細胞の多能性保持・維持に関する基礎的データを集積する。特に、低酸素状態での解析を実施する。

(2)iPS 細胞を使って再生療法を行う上で不可欠な足場材の開発・検討を行う。

3. 研究の方法

(1)iPS 細胞の取り扱いの容易さから、本研究では理研 CELL BANK より購入したマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17, iPS-MEF-Ng-178B-5) を用いた。MEF を播種した培養皿上にマウス iPS 細胞を、FBS, 2-Mercaptoethanol, NEFF, mouse LIF, penicillin/streptomycin, bFGF 添加 DMEM で5日間培養した。継代後、 1.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、5%および20%O₂ の条件で7日間培養ののち、形態学的かんさつと細胞数計測を行った。

(2)4 因子、3 因子導入マウス細胞は、MEF を播種した 6 well-dish 上に、 1.0×10^4 cells/cm² の密度で播種し、5%および20%O₂ の条件で骨芽細胞への分化誘導培地および未分化維持培地で20日間培養した。培養、3, 7, 15, 20 日目に alizarin red S 染色を行い、石灰化の程度を検討した。

(3)HIFs の機能を解明するために、siRNA を使ったノックダウン試験を行った。理研 CELL BANK より購入した3因子導入マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-178B-5) を用いた。MEF を播種した培養皿上に、マウス iPS 細胞を5日間 FBS, 2-Mercaptoethanol, NEAA, mouse LIF, penicillin/streptomycin, bFGF 添加 DMEM で培養した。継代時に siRNA をト

ランスフェクションしたマウス iPS 細胞を 60 mm 培養皿上に 1.0×10^5 cell/cm² の密度で播種し、5%O₂ 下で48時間培養した。それぞれの培養皿には 50 nM siRNAs {Product Names: Mm_Hif1a_4FlexiTube siRNA, Mm_Epas1 (Hif2a)_5FlexiTube siRNA, Mm_Hif3a_5FlexiTube siRNA, QIAGEN} に HiPerfect transfection reagent (QIAGEN) を添加しており、siRNA 導入48時間後に細胞を回収し、細胞形態、Nanog, Oct4, Sox2 の mRNA 発現量を比較した。対照群として、AllStars Negative Controls (QIAGEN) をトランスフェクションしたものを用いた。

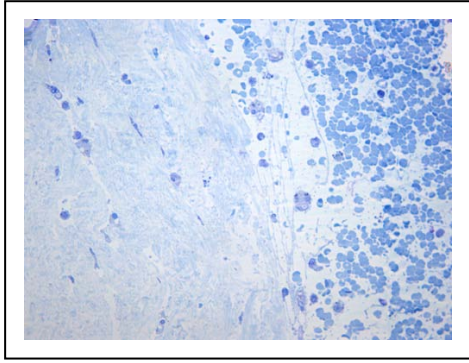
(3)テラピアコラーゲンの足場材への活用を目的に、物性 (変性温度、保存法)、生体適合性 (皮下埋入試験)、安全性試験 (細胞毒性試験、感作性試験) を実施した。

4. 研究成果

(1)4 転写因子と3 転写因子導入マウス iPS 細胞を比較して、低酸素培養条件下でも増殖・分化に有意差のないことが明らかとなった。骨分化誘導時においても、4 因子と3 因子導入マウス iPS 細胞を比較して有意差のないことが明らかとなった。すなわち、5%低酸素、20%正常酸素濃度で、未分化維持、分化誘導に関して、4,3 因子で差はなかった。

(2)マウス iPS 細胞は低酸素環境下で、HIFs の働きによって未分化状態が維持されている。特にコロニー形成に関しては、コロニーサイズの顕著な縮小が生じ、HIF-2 α の関与が明確となった。多能性マーカー (Nanog, Oct4, Sox2) の発現に関しては、HIF-2 α および-3 α の働きが重要であった。したがって、HIFs の中で、HIF-2 α が特に多能性発現に重要である。5%低酸素 HIF ノックダウン効果は、48時間持続した。

(3)魚コラーゲンの物性で最も重要な変性温度に関して、テラピア皮膚由来のアテロ化タイプ I コラーゲンは 35~36°C であることが確認でき、ヒトへの利用への可能性が明らかとなった。変性温度との関係で重要な保存条件として溶媒である PBS(-) の濃度を上げることによって4°C で1月程度は可能である。皮下埋入試験では、1週間程度で完全に分解吸収されること炎症所見の皆無であることを確認した。また、細胞毒性試験、感作性試験はいずれも陰性所見を得た。



魚コラーゲンの歯髄への埋入試験。術後1日目、軽度な炎症反応を認める。

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7件)

- ① Kawakubo A, Matsunaga T, Ishizaki H, Yamada S, Hayashi Y. Zinc as an essential trace element in the acceleration of matrix vesicles-mediated mineral deposition. *Microscopy research and techniques* 74, 1161-1165, 2011.
- ② 柳川嘉治郎、首藤 実、川崎 綾、杉本浩司、池田 毅、山田志津香、林 善彦、根管充填用レジンシーラーの生体親和性、日本歯内療法学会雑誌、32(3)、212-216、2011
- ③ Kawasaki A, Hayashi Y, Yanagiguchi K, Yamada S, Syudo M, Igawa K, Ikeda T, Kubo S, Fujiwara M. Effects of eluted components from 4-META/MMA-TBB adhesive resin sealer on osteoblastic cell proliferation. *Journal of dental Sciences* 7, 94-98, 2012.
- ④ Kaida K, Yamashita H, Toda K, Hayashi Y. Effects of glucosamine on the tooth pulpal nociceptive responses in the rat. *Journal of Dental Sciences* 8, 68-73, 2013.
- ⑤ Yamada S, Nagaoka H, Terajima M, Tsuda N, Hayashi Y, Yamauchi M. Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. *Dental Materials Journal* 32, 1-8, 2013.
- ⑥ Kubo S, Yokota H, Yokota H, Hayashi Y. Challenges to the clinical placement and evaluation of adhesively-bonded, cervical composite restorations. *Dent Mater*, 29(1), 10-27, 2013.
- ⑦ Yamada S, Yoshizawa Y, Kawakubo A, Ikeda T, Yanagiguchi K, Hayashi Y. Early gene and protein expression associated

with osteoblast proliferation and differentiation in response to fish collagen peptides. *Dental Materials Journal* 32, 233-240, 2013.

〔学会発表〕(計4件)

- ① 杉本浩司, 石崎秀隆, 林 善彦: 3因子・4因子導入マウス iPS 細胞の低酸素培養における増殖・分化について、第134回日本歯科保存学会春季学術大会、平成23年6月、浦安市
- ② 杉本浩司, 石崎秀隆, 池田 毅、林 善彦: 低酸素下におけるPS細胞の増殖・分化挙動、第32回日本歯内療法学会学術大会、平成23年7月、長崎市
- ③ 杉本浩司, 吉澤 有, 石崎秀隆, 林 善彦: マウス iPS 細胞の低酸素下培養におけるHIF(Hypoxia Inducible factor) の役割、第136回日本歯科保存学会春季学術大会、平成24年6月、宜野湾市
- ④ 林 善彦: 歯髄再生に使用する足場材、第10回日本再生歯科医学会、平成24年9月、神戸市

〔図書〕(計4件)

- ① Hayashi Y. Application of chiosan oligosaccharide and glucosamine in dentistry. In *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press-Taylor & Francis Group, pp. 447-460, 2010.
- ② Hayashi Y, Yamada S, Ikeda T, Yanagiguchi K. Fish collagen and tissue repair. In "Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects", ed. S-K. Kim, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 133-141, 2011.
- ③ Hayashi Y, Yamada S, Yanagiguchi K, Koyama Z, Ikeda T. Chapter 6 Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medicine. In *Marine Medical Food*, Volume 65, AFNR, ed. Se-Kwon Kim, UK: Academic Press, pp. 107-120, 2012.
- ④ Hayashi Y, Yanagiguchi K, Koyama Z, Ikeda T, Yamada S. Chapter 16 Chitosan Application in Dentistry. In *Marine Nutraceuticals: Prospects and perspective*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press-Taylor & Francis group, pp. 233-242, 2013.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 善彦 (HAYASHI YOSHIHIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20150477

(2) 研究分担者

山田志津香 (YAMADA SHIZUKA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：00363458