

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592874

研究課題名(和文) iPS細胞由来歯髄幹細胞の均質化・大量増幅による歯髄・象牙質再生療法の実現化

研究課題名(英文) The achievement of dental pulp and dentin regeneration therapy by homogenizing and a large amount of amplification of iPS cell origin dental pulp stem cell

研究代表者

池田 毅 (IKEDA, Takeshi)

長崎大学・大学病院(歯学系)・講師

研究者番号：90244079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：キチンは、N-アセチル-D-グルコサミンを基本構成単位とする生体内高分子のアミノ多糖体である。また自然界ではセルロースに次いで多量に存在し、キチンを脱アセチル化処理して得られるキトサンは生体親和性、生分解性や細胞接着に優れ、様々な形状への加工特性も担持することから細胞の足場となる天然素材として有益なバイオマテリアルの一つである。

そこで、組織再生を目指した細胞の足場材として、キトサンから作製した多孔性担体の機械的特性やエンドトキシンに対する安全性、また細胞増殖因子や液性因子を添加した場合の徐放性について検討し、さらに歯髄組織中への埋入に伴う生体反応について検討を加え一定の成果がみられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the properties of a chitosan porous scaffold. A porous chitosan sponge was prepared by the controlled freezing and lyophilization of different concentrations of chitosan solutions. The materials were examined by scanning electron microscopy, and the porosity, tensile strength, and basic fibroblast growth factor release profiles from chitosan sponge were examined in vitro. The morphology of the chitosan scaffolds presented a typical microporous structure, with the pore size ranging from 50 to 200  $\mu\text{m}$ . The porosity of chitosan scaffolds with different concentrations was approximately 75-85%. The relationship between the tensile properties and chitosan concentration indicated that the ultimate tensile strength for the sponge increased with a higher concentration. The in vitro bFGF release study showed that the higher the concentration of chitosan solution became, the longer the releasing time of the bFGF from the chitosan sponge was.

研究分野：歯内療法学

キーワード：再生医療 スキャフォールド 機械的物性 キトサン 徐放性

## 1. 研究開始当初の背景

現在までに細胞移植に向けた iPS 細胞の研究は様々な方面から国内外問わず急速に進行しており、ヒト iPS 細胞の分化誘導法の開発やマウス iPS 細胞を用いたモデルマウスの前臨床試験も相次いで報告されている (Science 1920-23, 2007, Proc Natl Acad Sci USA 106:808-13, 2009, Biomaterials 32: 2032-42, 2011) が、この技術をヒトへ実用化するためには乗り越えなければならない幾つかの問題がある。

1) 第一に、患者を救う臨床応用を目指す現場では iPS 細胞の重要な課題である遺伝子導入などによるゲノムの品質に与える影響、特にそこから起因する癌化の問題を解消し安全に樹立することやさらにそれらを大量に未分化状態を維持増殖させる培養システムを確立することである。

当初創製された iPS 細胞は Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2 の 4 因子をレトロウイルスベクターで導入していたが、c-Myc は有名な原癌遺伝子でありこの iPS 細胞から作製されたキメラマウスは約 20% の確立で腫瘍が発生すると言われ (Nature 448:313-17, 2007)、その後 c-Myc 以外の 3 因子でも低効率ながら樹立可能となった (Nature Biotechnol 26, 101-06, 2008)。また最近ではウイルスベクターを用いない一過性の遺伝子発現による iPS 細胞の作製 (Nature Methods 7, 197-99, 2010, Cell Stem Cell, 7, 11-14, 2010) やタンパク質導入法 (Cell Stem Cell, 4, 381-84, 472-76, 2009) や micro RNA の導入によるリプログラミング法の開発 (Cell Stem Cell, 8, 633-38, 2011) が報告され、当研究室においても理研より取得したマウス iPS 細胞様細胞を用いて低酸素培養条件下で、従来のもと同等の多能性や分化能を有しているかどうかを検索中である (第 134 回日本歯科保存学会学術大会 2011 年で一部報告)。また iPS 細胞株化が効率的に迅速に移植治療に実用可能な細胞数まで増殖させる培養システムが確立できなければ、目的とする特定の体性幹組織細胞への増幅・分化が遅くなり臨床実用ではない。そこでこの点を解決するために、我々は 2 年前より in vitro 系にて株化ヒト前骨芽細胞様細胞の継代培養操作を検討した結果、魚類由来コラーゲンである Fish Collagen Peptide (以下 FCP と略す) を極低濃度 (0.005mM) を添加することによって約 7 日後にコンフルエントとなったことより細胞増殖促進効果が確認できた。次いで硬組織誘導培地を用いた骨芽細胞への分化に関して mRNA 発現増強を定量的に検討したところ、ALP、Osteocalcin および BMP-2 において FCP 添加によって有意に遺伝子発現の増強がみられた。また形態学的にも ALP 免疫染色、von kossa 染色およびアリザリンレッド染色にて石灰化様分泌物が確認できた (J of Endod 36(12), 1988-90, 2010 にて報告)。また同様にマウス切歯歯髓組織

由来幹細胞に極低濃度 (0.001mM) 添加し継代培養を行ったところ、ALP、Osteocalcin および DSP において有意に発現の増強がみられ、形態学的にもカルセインにてラベリングした生細胞に対し共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、象牙質様細胞外基質形成促進作用が確認できた (Microsc Res and Technol 74, 2011 にて報告)。これらの結果より骨および歯髓組織における硬組織再生に対し FCP の有用性が実証できた。これらの知見を元に今後の iPS 細胞を利用する移植療法へ展開するにあたり、現実的には細胞の移植手技の簡便さや確実性が求められるため、さらに精度の高い歯髓細胞や象牙芽細胞への分化誘導および体内におけるより迅速な細胞増殖法の開発が必要であると考え「研究計画・方法」内で述べている膜遊走細胞分離法および還流培養システムを利用した実験系を検討する。

2) 次に将来人体に用いる医療を前提とした場合、坦体として用いる材料の安全性の確保は当然のことながら、その形状物性や化学的特性さらには様々な細胞賦活因子を徐放させるなどの付加機能性、適切なタイミングでの生分解性、加工性などを考慮したマテリアルエンジニアリングとしての研究、開発が急務である。これには細胞培養のための最適な Scaffold を創製することであり、その求められる条件は

A) 細胞活動に適した物理学的 3 次元環境であること。

B) 生体内に近似した生化学的環境を与えること。

C) 細胞機能を活性化する材料基盤であること、が挙げられる。

A) には効率的に細胞や血管が侵入しやすいことが必要なことから多孔性材料、特に多孔体の気孔どうしがつながった連通構造を持つことが重要である。従来より象牙芽細胞形成の最適な気孔径は 50 ~ 100  $\mu\text{m}$  されており (Journl of Dental Reserch 83:590-95, 2004)、さらにはハニカム状トンネル型気孔構造により細胞同士を密集させ成長因子などの一時貯留を可能にし、ECM の蓄積を容易になるといわれている (Biotechnol Bioeng 95:404-411, 2006)。

B) には坦体と細胞の複合体へ象牙質形成能を上昇させるような活性因子 (bFGF など) を導入し、さらにその薬剤徐放能を有するマテリアルを応用することが挙げられる。この点に関して我々は、現在多孔性 FCP スポンジ状坦体を試作し移植材料としての適用性を検討中である。具体的には凍結乾燥処理により作製した多孔体に架橋構造を付与させることにより、機械的強度を増大させるとともに有効表面積の膨大化を図り増殖因子や分化誘導因子の徐放能が向上することが期待される。

C) には生体適合性および生分解性の高い材料であることが要求される。我々は既に約 2

年前より基礎的な側面から検討を継続しており、マウスから採取した歯髄細胞に対して FCP を 0.1% 添加し培養したところ、有意に細胞増殖効果が認められた。またこの際石灰化関連タンパク質である Osteocalcin や Osteopontin や BMP-2 の mRNA 発現およびタンパク発現を検討したところ、有意に発現増強が確認できた。また歯髄保存療法である直接覆髄法へ FCP を応用し病理組織学的に検討した結果、好中球の走化性誘導能が弱く、生体適合性が良好であることも確認できた (J of Endod 36(12), 1988-1990, 2010 にて報告)。これらの成果によって第 32 回日本歯内療法学会学術大会において「JEA 会長賞」を受賞することができた。

## 2. 研究の目的

日本発の画期的な研究成果として、マウス由来線維芽細胞において細胞分化のリプログラミングを 4 種類の遺伝子導入によって、あらゆる細胞に分化可能な人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が作製され (Cell, 126, 663-676, 2006)、さらにヒト iPS 細胞の樹立が報告された (Cell, 131, 861-872, 2007, Nature, 451, 141-146, 2008)。現在患者の組織から採取した体細胞を生体外で多分化能を有する iPS 細胞へ再分化させ、必要な細胞へ誘導した上で組織工学の技術を用いて生体外で 3 次元細胞培養し、それを生体内に戻し組織を再生するといった免疫拒絶のない「真の再生医療」の早期実現化が急務となってきた。そこで本研究は今後 3 ~ 4 年後の臨床実用化を目標に、新規の Biomaterial である Fish Collagen を iPS 細胞移植システムの Scaffold (担体) として創製し、特に歯髄組織および象牙質の再生医療技術の開発・確立を目指すものである。

## 3. 研究の方法

今後の iPS 細胞を利用した移植療法を展開するにあたり、まず第一には細胞間接着分子 E-cad-HER2 のモデル分子である固定型 E-cad-HER2 キメラタンパク質を用いた単一細胞レベルで分散させ、未分化状態を維持させながら増殖させ、iPS 細胞の均質化ならびに大量増幅を目指すことになる。次いで特定の細胞への分化誘導型培養を確立させる。すなわち SDF-1-CXCR4 (リガンド-受容体ペア) を利用した歯髄幹細胞遊走分離法を用い、硬組織誘導培養系への Fish Collagen Peptide (FCP) 添加により象牙芽細胞への分化誘導促進化を確認・評価する。さらに FCP 由来多孔性担体を用い三次元組織培養を行った細胞-担体複合体として、前臨床試験としての動物組織での再生効果を検証し、最終的には GMP 準拠の加工施設内でのヒト歯髄幹細胞の品質管理保証体制を構築し、ヒトへの細胞移植療法の臨床試験を目標に設定する。

## 4. 研究成果

(1) iPS 細胞増殖の均質化ならびに大量増幅人工多能性幹細胞受領契約の同意のもと、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) より寄託され

る「ヒト iPS 細胞」を用い、理研 BRC にて細胞の分配、維持培養や保管技術指導を受けながら 10% FBS を添加したヒト ES 細胞用培地 (Int. J. Dev. Biol. 48, 1149-54, 2004) に線維芽細胞成長因子 (bFGF: 10 g/ml) を添加した成長因子増殖法 (Stem Cells 23: 315-23, 2005) を応用し迅速大量培養を実施する。しかしながら従来の MEF などのフィーダー細胞上で培養するコロニー形成型培養法では、コロニーの状態によっては細胞周辺微小環境が異なるため、培地中のサイトカインなどの液性因子が均一に作用することが不可能であり、さらに異種動物由来の血清やフィーダー細胞が混入する免疫原性のリスクがあるため、本研究では E-cad-HER2 キメラタンパクマトリックスを用いた継代培養によって効率的に細胞増殖を目指す。この方法は単一細胞レベルで分散しながら未分化維持増殖させ、iPS 細胞の均質化および大量増幅が可能であるとされ (J Biol Chem 283: 26468-76, 2008)、適宜フローサイトメーターおよびリアルタイム PCR 法にて、Nanog や Oct3 や Sox2 遺伝子発現状況について検証し未分化性の維持を確認する。また多能性幹細胞をヒト ES 細胞用培地で浮遊培養することによって未分化状態を維持できると報告されており (Stem Cell Res 4: 165-179, 2010)、この方法を発展させ、細胞が常に新鮮な培養液と接す還流培養システム (Bioreactor) を用いて、100mm の培養皿 1 × 10<sup>6</sup> cells 播種し約 10 日後のコンフルエントを達成できた。

## (2) 歯髄幹細胞への分化誘導

最近多能性幹細胞を浮遊培養することで三次元的な立体構造を有する細胞凝集塊、すなわち胚様体形成させることで各種組織幹細胞へ分化可能となる誘導法 (胚様体形成法) を形成させる試みが報告されており (Nat Neurosci 8: 288-96, 2005)、レチノイン酸 (RA) 添加による ES 細胞の分化誘導に準じて、大学既設のセルソーターを用いて細胞表面マーカーとして CD105 陽性かつ CD31 陰性の分画となる細胞を分取し、幹細胞マーカーである CD29、CD44、CD73 および CD90 が陽性となることをフローサイトメトリック解析し、血管新生能および神経再生能を有する歯髄幹細胞であることを確認する。しかしながら CD105 陽性細胞をセルソーティングで分取する場合临床上安全性に問題があり、GMP 準拠の装置を準備することも実際的ではなく、また抗体ビーズ法の利用も高価となるため、将来のヒトへの臨床応用を想定した分化誘導の効率化が想定した場合は、国立長寿医療センターによって開発された歯髄幹細胞膜遊走分離法の技術支援を受ける計画である。この原理は CD105 陽性細胞においてケモカインである CXCR4 の分泌が高く、CXCR4 は SDF-1 をリガンドとするレセプターであり、CXCR4 の発現が高いということは SDF-1 に対して遊走能が大きいという性質を利用して、分離膜を介在させた分離法を利用することとなる

(Cytokine Growth Factor Rev 20:435-40, 2009)。

(3)FCP(Fish Collagen Peptide)添加による歯髄細胞ならびに象牙芽細胞への分化誘導促進化

分取培養された歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導を促進する目的で、硬組織誘導培地(アスコルビン酸、 $\alpha$ -グリセロリン酸およびデキサメサゾン含有 DMEM)へ極低濃度(0.001mM)の FCP 溶液を添加する。これらはヘテロな分化細胞から一細胞単位で特定の分化細胞を精密に抽出、精製する技術を応用する(Bionanoscience 2,p277-286,2012)。歯髄幹細胞の継代培養を行い、分化誘導状況については培養細胞の形態変化(大型化)を確認後、FCP 刺激により発現量が変化する遺伝子(Differentially Expresses Genes)を偽陽性なしに真の検出が可能である Gene Fishing 法を用い申請備品である DNA フラグメント解析システムにてスクリーニングを行う。その結果をもとに石灰化現象の指標である ALP, Type collagen, Osteocalcin,BMP-2 および Dentin sialoprotein のターゲット遺伝子を用いて教室既設のリアルタイム PCR 法による cDNA の厳密な定量分析を実施し分化レベルを検証する。形態学的にカルセインにてラベリングした生細胞に対し共焦点レーザー顕微鏡観察を行い、象牙質様細胞外基質形成促進作用が確認し、ALP 免疫染色、von kossa 染色にて観察し FCP の生物学的石灰化促進能を証明することができた。

(4) FC 由来 Scaffold( 担体 ) の作成および象牙芽細胞 担体複合体の形成

FCP を酢酸にて溶解させ、0.5,1,2%濃度に調整後、凍結乾燥処理を行い、さらに 0.1MEDC を架橋剤として用い物理的強度を向上させた状態で、既設の真空低温乾燥器を用いて5%アンモニア溶液に浸漬し密閉槽内で20h 反応させることにより発生する気体の均一な揮発効果により連通状気孔、すなわちハニカム状トンネル型多孔体が作成する(Biotechnol Bioeng 95:404-411,2006)。その際、担体への細胞接着が良好となり移植部位からの細胞拡散を防止するため、pore size が 100~300 $\mu$ m、気孔率が70~80%になるよう溶液の濃度調整を行い走査型電子顕微鏡にて確認する。しかしながら歯科治療を想定する場合、術野が狭く象牙質欠損部と同サイズの移植体を作製し露髄部へ固定することは非常に困難であることが予想されるため、多孔体よりも直接注入移植可能なインジェクタブルハイドロゲル(室温以下では溶液(ゾル)体内に注入後はゲル化する)を作製し移植細胞を包埋する方法も検討した。

硬組織再生促進化のための培養技術では、細胞の担体への侵入効率と担体内での増殖、分化の促進化が重要になってくる。そこで細胞侵入効率を上げるために減圧下(-100mg)で播種を行い多孔質体の中心部まで侵入させ、

その結果細胞の基質形成能を上昇させる。これにより従来法よりも短期間での生体内への培養細胞移植療法が実現可能となる。具体的には細胞播種から2~3週間後の生体内移植を目標とする。

実際の組織構築には細胞分裂に伴った段階的細胞供給と段階的細胞配置が相補的に複雑に関係しながら進行している。したがって細胞の高次構造の再構成には細胞自体の自己組織化機能に加え、人工的な細胞配置技術すなわち構成的な細胞集団の空間的配置を多孔性担体やハイドロゲルを用いて制御することが非常に重要である。

(5)前臨床試験としての実験動物への細胞移植

免疫抑制マウスを用い下顎骨表面より骨削合し、切歯歯根表面に露髄面を形成後、上記三次元象牙芽細胞 FCP 担体複合体を移植留置し、経時的な(移植後1~24週を目安)露髄面での細管性新生象牙質形成度について50kv, 0.75mAの条件下で当大学既設の実験動物用マイクロCTの使用協力を得て時系列的な画像解析を行うと共に、ALP, Osteocalcin,BMP-2 および BSP や DSP をマーカーとした in situ hybridization 法にて組織内の移植象牙芽細胞の局在性および新生象牙質基質を病理組織学的に検討をおこなった。また形態学的にも Ca 親和性のカルセインを用い当教室既設の共焦点レーザー顕微鏡にて硬組織形成度を定量評価し、実際の臨床応用におけるタイミングの良い移植時期を推察できるようになった。

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7件)

Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold  
Takeshi Ikeda, Kahori Ikeda, Kouhei Yamamoto, Hidetaka Ishizaki, Yuu Yoshizawa, Kajiro Yanagiguchi, Shizuka Yamada, and Yoshihiko Hayashi  
BioMed Research International Vol 2014, Article ID 786892, 8 pages(IF: 2.833)査読有り

Biological Safety of Fish (Tilapia) Collagen  
Kohei Yamamoto, Kazunari Igawa, Kouji Sugimoto, Yuu Yoshizawa, Kajiro Yanagiguchi, Takeshi Ikeda, Shizuka Yamada, and Yoshihiko Hayashi  
BioMed Research International Vol 2014, Article ID 630757, 9 pages(IF: 2.833)査読有り

Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine  
Shizuka Yamada, Kohei Yamamoto, Takeshi Ikeda, Kajiro Yanagiguchi, and Yoshihiko Hayashi  
BioMed Research International Vol 2014, Article ID 302932, 8 pages(IF: 2.833)査読有り

り

D-glucosamine promotes transfection efficiency during electroporation, Igawa K, Ohara N, Kawakubo A, Sugimoto K, Yanagiguchi K, Ikeda T, Yamada S, Hayashi Y, BioMed Research International, vol. 2014, Article ID 485867, 4 pages, 2014. doi:10.1155/2014/485867.(IF: 2.883)査読有り

Early gene and protein expression associated with osteoblast proliferation and differentiation in response to fish collagen peptides. Yamada S\*, Yoshizawa Y\*, Kawakubo A, Ikeda T, Yanagiguchi K, Hayashi Y Dental Materials Journal 32(2): 233-240, 2013 (IF: 1.137)査読有り

Effects of Hypoxia on Pluripotency in Murine iPS Cells. Sugimoto K, Yoshizawa Y, Yamada S, Igawa K, Hayashi Y, Ishizaki H: Microscopy Research and Technique 76(10): 1084-1092, 2013 (IF: 1.593)査読有り

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(2), 94-98, 2012. (IF:0.222)査読有り

〔学会発表〕(計7件)

Ikeda T., Yamamoto K., Yoshizawa Y., Ikeda K., Yamada S., Hayashi Y.: The Physicochemical Properties of Fish Collagen in Regeneration Medicine, 7th IADR/PER (Dubrovnik), Abstr. No. 168, September 10-13, 2014.

Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Yoshizawa Y, Sugimoto K, Ishizaki H, Yamada S, Yanagiguchi K, Hayashi Y: Properties of chitosan scaffold for pulp tissue engineering. 10th Asia Pacific Chitin & Chitosan Symposium, 5th October, 2013, Yonago, Tottori, Japan

池田 毅, 吉澤 祐, 柳口嘉治郎, 山本耕平, 山田志津香, 林 善彦: 足場材としての魚コラーゲンの安全性試験 第138回日本歯科保存学会秋季大会, 2013年6月27日, 福岡国際会議場, 福岡市

牧野亜紀子, 西山由美, 本多夏子, 村井里衣, 山口やよい, 池田 毅: 歯牙漂白(ホワイトニング)の社会的認知度について. 日本歯科衛生学会 第8回学術大会, 2013年9月15日, 神戸国際会議場, 神戸市

林 善彦, 山本耕平, 池田 毅, 柳口嘉治郎, 山田志津香: 再生医療用足場材としての魚コラーゲンの安全性評価, 第139回日本歯科保存学会秋季大会, 2013年10月17日, 秋田県総合生活文化会館, 秋田市

吉澤 祐, 池田 毅, 山本耕平, 杉本浩司,

山田志津香, 林 善彦: Fish collagen による骨再生療法の有用性 第139回日本歯科保存学会秋季大会, 2013年10月17日, 秋田県総合生活文化会館, 秋田市

Ikeda T, Yamamoto K, Sugimoto K, Ishizaki H, Yamada S, Yanagiguchi K, Hayashi Y: Properties of chitosan scaffold for pulp tissue engineering. International Association for Dental Research, Iguacu, Brazil, 18<sup>th</sup> June 2012  
〔図書〕(計2件)

Chapter 16 Chitosan Application in Dentistry. Hayashi Y, Yanagiguchi K, Koyama Z, Ikeda T, Yamada S

In Marine Nutraceuticals: Prospects and perspective, (Se-Kwon Kim eds; CRC Press-Taylor & Francis group) pp. 233-242, 2013

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.

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: 骨再生剤及び骨を再生する方法  
発明者: 林 善彦, 山田志津香, 池田 毅, 柳口嘉治郎

番号: 国内特許第5229937号()

取得年月日: 2013.3.29 登録

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 毅 (IKEDA, Takeshi)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号: 90244079

(2) 研究分担者

山田 志津香 (YAMADA, Shizuka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 00363458

石崎 秀隆 (ISHIZAKI, Hidetaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 80569963

池田 香 (IKEDA, Kahori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号: 20578330