

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11224

研究課題名(和文) 培養表面のstiffness(剛性)による歯根膜由来細胞の分化制御

研究課題名(英文) Differentiation control of periodontal ligament cells by the stiffness of culture surface

研究代表者

岩田 隆紀 (IWATA, Takanori)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60431946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト間葉系幹細胞の様々な機能により、既存治療では治すことのできないアンメットメディカルニーズに対する臨床応用は進んでいるが、そのメカニズムに関しては未知の部分が多い。一方では間葉系幹細胞を培養する際に基材の硬さを変えることで分化制御ができることが明らかとなってきた。本研究ではヒト歯根膜由来間葉系幹細胞を特にstiffnessによって分化制御する方法を検討し、再生治療製品の開発を念頭に、骨再生するための最適な表面硬さを見出した。また次世代シーケンサーにより硬さの違いによる遺伝子発現の変化を解析した。以上より、硬い表面硬さが間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although clinical application of human multipotent mesenchymal stromal cells (hMSCs) has been spread for unmet medical needs, the mechanisms is not well understood. It is important to define which hMSCs are effective and how to transplant hMSC, so the evaluation index of hMSCs has been explored. Our laboratory introduced osteoinductive medium, which contains ascorbic acid, beta-glycerophosphate, and dexamethasone, for cell culture of human periodontal ligament-derived MSCs, transplanted them to periodontal defects, and observed true periodontal regeneration. Recent studies indicated the stiffness can control the differentiation of hMSCs. In this study, we cultured hMSCs on the different stiffness culture surface, and observed that higher stiffness induced more osteogenic phenotypes of hMSCs. Next generation sequencer revealed the change of gene expression by the difference of stiffness. These results suggested the stiffness of culture surface modulate the differentiation of hMSCs.

研究分野：歯周組織再生学

キーワード：硬さ 間葉系幹細胞 分化 再生医療 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

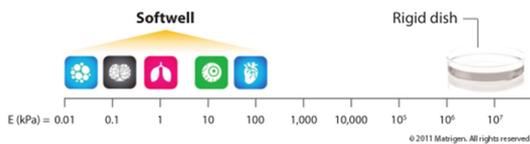
ヒト間葉系幹細胞の様々な機能により、既存治療では治すことのできないアンメットメディカルニーズに対する臨床応用は進んでいるが、そのメカニズムに関しては未知の部分が多い。一方では間葉系幹細胞を培養する際に基材の硬さを変えることで分化制御ができることが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

本研究ではヒト歯根膜由来間葉系幹細胞を特に stiffness によって分化制御する方法を検討し、再生治療製品の開発を念頭に、その分化の最適条件の検索を目的とした。また、足場基材硬さの変化による遺伝子発現の差異を次世代シーケンサーを用いて解析し、硬さがどのように生物学的な影響を及ぼすかを検討することを目的とした。

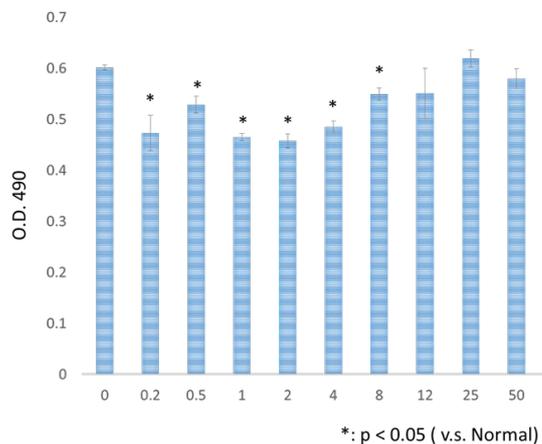
3. 研究の方法

東京女子医科大学倫理委員会承認を経て、ヒト抜去歯牙歯根膜組織より間葉系幹細胞を抽出した。通法に従い、拡大培養し、継代3回目の時点で小分けにされ凍結保存した。市販の硬さ 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 25, 50kPa の硬さを示すマルチウェルディッシュにて歯根膜由来間葉系幹細胞を培養し、その接着増殖能ならびに分化能を測定した。

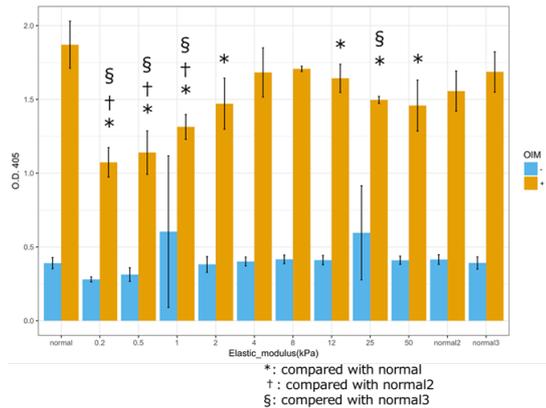


4. 研究成果

接着試験においては、0.2~8kPa の比較的柔らかい基材上においてはその接着増殖能が有意に低下した。



また同様の条件において硬組織誘導試薬の添加による ALP 活性を測定したところ、通常硬さのディッシュと比較して 4,8kPa 以外の硬さにおいて ALP 活性が優位に低下した。



4,8kPa ならびに通常硬さのプラスチックディッシュにおいて歯根膜由来間葉系幹細胞を培養し、トータル RNA を回収し、次世代シーケンサーにてその遺伝子発現を解析したところ、20%程度の遺伝子発現に変化があった。以上より、歯根膜由来間葉系幹細胞の骨分化・歯根膜分化における最適培養基材硬さが明らかとなった。

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 11 件)

- Enoki Y, Sato T, Kokabu S, Hayashi N, Iwata T, Yamato M, Usui M, Matsumoto M, Tomoda T, Ariyoshi W, Nishihara T, Yoda T. Netrin-4 Promotes Differentiation and Migration of Osteoblasts. **In Vivo**. 31:793-799. 2017. 0.953.
- Kaibuchi N, Iwata T, Onizuka S, Yano K, Yamato M, Okano T*, Ando T. Cytological character of mini pig mesenchymal stromal cells from various tissues and the attempt of cell sheet formation. **Regen Ther**. 6: 83-89. 2017.
- Hamada M, Iwata T, Kato Y, Washio K, Morikawa S, Sakurai H, Yamato M, Okano T*, Uchigata Y. Xenogeneic transplantation of

- human adipose-derived stem cell sheets accelerate angiogenesis and the healing of skin wounds in a Zucker Diabetic Fatty rat model of obese diabetes. **Regen Ther.** 6: 65-73. 2017.
4. Nagase K, Sakurada Y, Onizuka S, Iwata T, Yamato M, Takeda N, Okano T. Thermo-responsive polymer-modified microfibers for cell separations. **Acta Biomater.** 53:81-92. 2017. 6.319.
 5. Kato Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Kuroda H, Morikawa S, Hamada M, Ikura K, Yamato M, Okano T, Uchigata Y. Creation and transplantation of an adipose-derived stem cell (ASC) sheet in a diabetic wound-healing model. **J Vis Exp.** (126). doi: 10.3791/54539. 2017. 1.232.
 6. Onizuka S, Iwata T, Park SJ, Nakai K, Yamato M, Okano T, Izumi Y. ZBTB16 as a Downstream Target Gene of Osterix Regulates Osteoblastogenesis of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. **J Cell Biochem.** 117:2423-34. 2016. 3.085.
 7. Kaibuchi N, Iwata T, Yamato M, Okano T, Ando T. Multipotent mesenchymal stromal cell sheet therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a rat model. **Acta Biomater.** 42:400-410. 2016. 6.319.
 8. 鬼塚理, 岩田隆紀*. 細胞シートを用いた歯周組織の再生. **歯**. 43:56-62. 2018.
 9. 岩田隆紀. 間葉系幹細胞を用いた再生医療. **未来医学**. 31:79-83. 2018.
 10. 岩田隆紀. 歯科再生治療の展望. **Progr Med.** 37:577-581. 2017.
 11. 岩田隆紀. 細胞シートを用いた歯周組織の再生. **九州歯会誌**. 70:73-80. 2016.
- 〔学会発表〕(計 18 件)
1. Onizuka S, Yamazaki Y, Sugimoto T, Sone Y, Takeda A, Park SJ, Nakai K, Iwata T, Yamato M, Okano T. Whole transcriptome analysis of MSCs derived from different types of tissue reveals unique profiles. ASBMR 2017 Annual Meeting. Denver, CO, USA. 2017/9/11.
 2. Iwata T and Onizuka S. The effect of stiffness on the differentiation of human mesenchymal stromal cells. ICAFM 2017. Los Angeles, CA, USA. 2017/8/5.
 3. Iwata T. The establishment of safety and efficacy evaluation for allogeneic periodontal ligament derived multipotent mesenchymal stromal cell sheet with next-generation sequencer. 1st Groval Symposium for CSTE. Salt Lake city, UT. USA. 2017/7/18.
 4. Iwata T. 培養歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再建への応用. 中日口腔医学フォーラム. Beijing, China. 2017/6/10.
 5. 岩田隆紀. 間葉系幹細胞シートを用いた再生治療. 第 40 回未来医学研究会大会. 東京. 2017/4/22.
 6. 岩田隆紀, 鬼塚理, 伊豆原るな, 鷺尾薫, 妻沼有香, Sung-Joon Park, 中井謙太, 和泉雄一, 安藤智博. 歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再生と展望. 第 16 回日本再生医療学会総会. 仙

- 台 2017/3/8.
7. 岩田隆紀. 自家歯根膜細胞シートによる歯周組織の再建. 九州臨床再生歯科研究会. 福岡. 2017/3/4.
 8. 岩田隆紀. 老化で加速する歯周病の再生医療. 第9回ヘルシエイジング学会. 東京. 2017/2/25.
 9. 岩田隆紀. 細胞シートを使った歯周組織再生 - 自己細胞から同種細胞へ -. 第26回インテリジェント材料・システムシンポジウム. 東京. 2017/1/11.
 10. Iwata T, Yamato M, Washio K, Tsumanuma Y, Yamada A, Onizuka S, Izumi Y, Ando T, Okano T, Ishikawa I. Periodontal Regeneration with Autologous Periodontal Ligament-derived Cell Sheets. 2016 TERMIS-AP. Taipei, Taiwan. 2016/9/5.
 11. 岩田隆紀. ALP 欠損と歯科病変 - 歯根膜由来細胞シートによる歯周組織再生治療の展望. 第34回日本骨代謝学会学術集会. 大阪. 2016/7/21.
 12. 岩田隆紀. 細胞シートを用いた歯周組織の再生. 第76回九州歯科学会総会学術大会. 北九州. 2016/5/29.
 13. 岩田隆紀, 朴聖俊, 各務秀明, 中井謙太, 大和雅之. 次世代シーケンサーによる再生医療のためのヒト間葉系幹細胞の品質管理. BMB2015. 神戸. 2015/12/2.
 14. 岩田隆紀. 臨床応用を目指した歯科再生医療. 第19回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 横須賀. 2015/11/28.
 15. Onizuka S, Iwata T, Park SJ, Yamada A, Nakai K, Yamato M, Okano T, Izumi Y. Whole transcriptome analysis reveals osteoblastic related genes for human periodontal ligament derived multipotent mesenchymal stromal cells. American Academy of Periodontology 2015 Annual Meeting, Orland, FL, USA. 2015/11/15.
 16. 鬼塚理, 岩田隆紀, 朴聖俊, 中井謙太, 大和雅之, 岡野光夫, 和泉雄一. Osterix の下流にある ZBTB16 はヒト歯根膜由来間葉系幹細胞における骨芽細胞分化を制御する. 日本歯科保存学会 2015. 東京. 2015/11/13.
 17. Kaiabuchi N, Iwata T, Washio K, Kato Y, Okamoto T, Yamato M, Okano T, Ando T. Cytotherapy using allogeneic multipotent mesenchymal stromal cell sheets for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. ICOMS2015. Melbourne, Austraria. 2015/10/29.
 18. 岩田隆紀. 自己培養歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再建. 第33回日本骨代謝学会学術集会. 東京. 2015/7/24.
- 〔図書〕(計 3件)
1. 岩田隆紀. 再生医療の法令と臨床応用に向けた取り組み 日本臨床衛生検査技士会監修, **JAMT 技術教本シリーズ 臨床検査技師のための臨床研究・治療ハンドブック**, じほう, 東京, 183-186. 2016.
 2. 岩田隆紀. 歯根膜細胞シートによる歯周組織再生. **再生医療等製品の開発と実用化展望**, 株式会社シーエムシー出版, 東京, 150-155. 2016.
 3. 岩田隆紀. 歯周領域における再生医療. 先進医療フォーラム編, **先進医療 NAVIGATOR 本日の再生医療**, 日本医学出版, 東京, 62-64. 2016.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/ABMES/>

6．研究組織

(1)研究代表者

岩田 隆紀 (IWATA, Takanori)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60431946

(2)研究分担者

鷺尾 薫 (WASHIO, Kaoru)

東京女子医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：50514486

(平成 29 年 5 月 1 日削除。削除理由：研究分担者である鷺尾薫は他の研究事業に専念することとなり、本基盤研究における分担研究の継続が困難となったため。)

(3)連携研究者

大和 雅之 (YAMATO, Masayuki)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：40267117

岡野 光夫 (OKANO, Teruo)

東京女子医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：00130237

石川 烈 (ISHIKAWA, Isao)

東京医科歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：10014151