

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20412

研究課題名(和文) iPS細胞より誘導された象牙芽細胞による新規修復治療の開発

研究課題名(英文) Induction of odontoblast from iPS cells for novel dental restorative method.

研究代表者

中島 啓(Nakajima, Kei)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20733463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、iPS細胞を象牙芽細胞へと分化・誘導させ、生体内で象牙質を形成させることを目的とした。iPS細胞から象牙芽細胞へ誘導するため、胚葉体(EB)を作製し、レチノイン酸とBMP-4にて誘導を行ったところ、象牙芽細胞に誘導されたことが示唆された。また、共SOX11をノックダウンすると、象牙芽細胞への分化が優位に低下することが明らかとなった。誘導象牙芽細胞をマウス生体内に移植したところ、骨様硬組織の形成はみられたが、明らかな象牙質形成を認めなかった。本研究より、SOX11は象牙芽細胞誘導において重要な役割を示すことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate odontoblast induction and differentiation from iPS cells, and dentin formation using induced cells in vivo. To induce for odontoblast, embryonic bodies (EB) were formed from iPS cells and cultured with retinoic acid and BMP-4. It was suggested that induced cells were odontoblasts by PCR and immunohistochemistry. It was shown that differentiation into odontoblasts significantly decreased in SOX11 knockdown group. Transplantation of induced odontoblasts into mice was formed bone-like hard tissues, however dentin formation was not clear. These results indicate that SOX11 is considered as an important upstream control gene in odontoblast differentiation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：iPS細胞 分化誘導 象牙芽細胞 象牙質

## 1. 研究開始当初の背景

歯は、食物を咀嚼しその消化を助けるだけでなく、咬合関係や発音など重要な役割を担っている。歯は歯冠部最表層にエナメル質、歯根部最表層にセメント質があり、その下層には硬組織である象牙質が存在する。内腔には、象牙芽細胞、線維芽細胞、血管および神経組織を含む歯髄が存在し、脈管のない象牙質へ栄養を供給し知覚を与えている。象牙質、歯髄は発生学的にも歯胚間葉組織である歯乳頭という同一の組織より発生することから、両者は象牙質・歯髄複合体と呼ばれ、一塊の組織として考えられている。う蝕や外傷などにより象牙質が露出されると、外来性の刺激により炎症性起因物質が発生し、歯髄局所に炎症が起こることが知られている。

う蝕や外傷などにより歯の硬組織が障害された場合、感染した歯質を取り除き、材料ごとに適した形態に修正後、修復材料により補われる。現在の修復治療として、金銀パラジウム合金をはじめとした金属、セラミックやレジンなどの人工物による代替治療が行われている。これらの修復治療により、歯の咀嚼や発音などの機能は回復可能であるが、材料と歯の硬組織との弾性やひずみの違いにより、時間経過とともに微小漏洩などが課題として挙がっている(Murray, P. E. et al., 2002)。修復物と象牙質との漏洩だけでなく、金属材料には金属アレルギーも問題となっており、アレルギー性の少ない材料への転向も進められている。このような背景から、生体為害性がなく、より歯の硬組織に近い修復材料による治療が望まれている。

iPS 細胞は、患者本人の成熟した細胞から作製可能であり、ES 細胞同様にほぼ全ての細胞に分化誘導可能であることから、臨床への応用が期待されている。歯科領域でも、口腔内の細胞から iPS 細胞の樹立が報告され(Egusa, H. et al., 2010)、iPS 細胞から歯胚由来間葉細胞や象牙芽細胞に誘導可能とする報告もある(Otsu, K. et al., 2012, Ozeki, N. et al., 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、う蝕などにより失われた象牙質を再生象牙質で修復する治療を開発することを目的として、iPS 細胞から象牙質を形成する象牙芽細胞への効率的に分化誘導させること、再生象牙質を生体内で形成させることを目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. iPS 細胞から象牙芽細胞への分化誘導

iPS 細胞から胚葉体 (EB) を作製し、接着させた EB から生え出した細胞に対して、誘導培地を用いて培養を行う。誘導にはレチノイン酸と BMP-4 を用いた。誘導の判定として、PCR 法による遺伝子発現解析および免疫染色によるタンパク質の発現解析を行う。

### 2. 誘導象牙芽細胞の遺伝子発現解析

誘導した象牙芽細胞が天然の象牙芽細胞と同等であるかを示すため、マイクロアレイ解析を行う。また、siRNA を用いて遺伝子をノックダウンさせ、象牙芽細胞分化に影響するかどうかを調べる。

### 3. 誘導象牙芽細胞の硬組織形成能の解析

誘導した象牙芽細胞が硬組織形成能を有しているかどうかを明らかにするため、誘導後に硬組織形成培地に変更し、硬組織形成の解析を行う。形成組織は、アリザリンレッドおよびアルカリホスファターゼにて染色し視覚化する。

### 4. 誘導象牙芽細胞の生体内移植方法の確立

生体内での象牙質形成が可能かどうかを明らかにするため、誘導象牙芽細胞を抽出し、生体内移植を行う。生体内への移植部位として、腎臓被膜下、精巣、皮下について移植を行い、マイクロ CT を用いて硬組織の形成に最適部位を探索する。硬組織の形成がされない場合は、歯髄の環境を模して、細いチューブや歯髄を除去した根管に細胞を入れて移植することで、形成を目指す。

### 5. 再生象牙質の組織解析

象牙芽細胞移植により生体内で形成された組織を同定するため、組織解析を行う。HE 染色に加えて、象牙質マーカーの免疫組織化学染色を実施する。

## 4. 研究成果

### 1. iPS 細胞から象牙芽細胞への分化誘導

iPS 細胞から象牙芽細胞へ効率良く誘導する方法の確立するため、サイトカインや培養方法を検討した。iPS 細胞から胚葉体 (EB) を作製し、レチノイン酸と BMP-4 を用いて誘導をおこなったところ、*DSPP* mRNA の発現が上昇した。

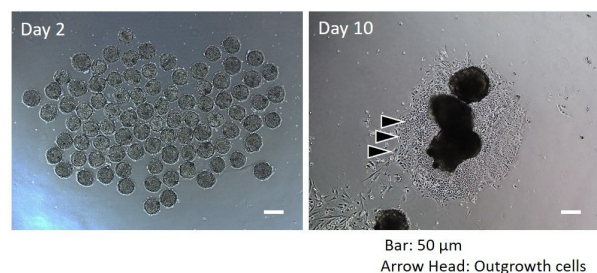


図1 iPS 細胞の EB と誘導培地にて培養し生え出した細胞の位相差顕微鏡像。

誘導細胞に対して免疫組織化学染色を行ったところ、EB より生え出した細胞において Nestin および DSP に陽性を認め、象牙細胞様の細胞であることが示唆された。

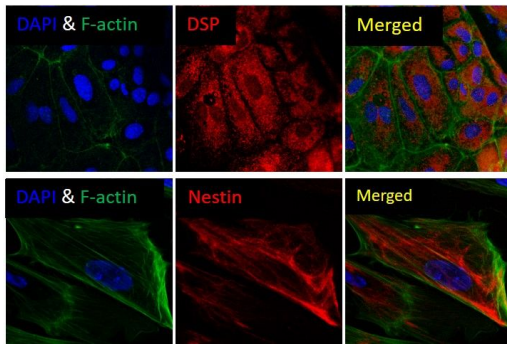


図2 誘導細胞における DSP および Nestin の免疫染色像。

## 2. 誘導象牙芽細胞の遺伝子発現解析

誘導象牙芽細胞において、マイクロアレイ解析を行った。歯髄細胞と比較したところ、共通する遺伝子がいくつか発見され、象牙芽細胞分化に重要な遺伝子であることが考えられた。また、共通する遺伝子の一つである *SOX11* をノックダウンすると、*DSPP* mRNA の発現が低下し、象牙芽細胞への分化が優位に低下することが明らかとなった。

## 3. 誘導象牙芽細胞の硬組織形成能の解析

誘導細胞を硬組織形成培地にて培養する予定であったが、細胞の誘導率が低く、十分な量の誘導細胞を確保できなかった。そのため、本項目は実施せず、項目4の移植実験を優先して行うこととした。

## 4. 誘導象牙芽細胞の生体内移植方法の確立

誘導象牙芽細胞の集塊を、シリコンチューブを用いて歯髄環境を模してマウス腎臓被膜下に移植を行った。移植後、腎臓周囲に充実性の腫瘍が形成された

## 5. 再生象牙質の組織解析

上記4の組織解析を行った結果、腫瘍の大部分には奇形腫(テラトーマ)が形成されており、一部に骨様の硬組織の形成を認めた。形成された硬組織は、分化させずに移植して形成されたテラトーマ内に形成されたものと遜色がなく、象牙質と断定するには根拠に乏しいと考えた。

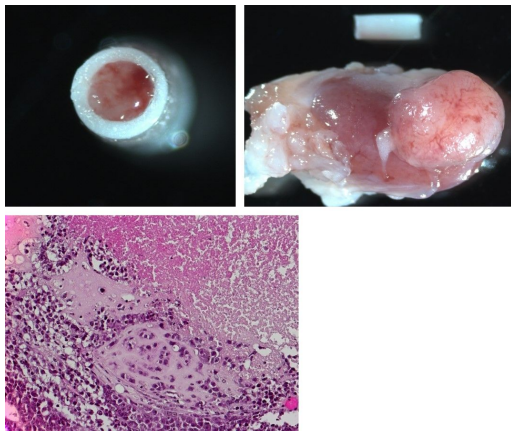


図3 移植に用いたシリコンチューブと形成された腫瘍の実体像(上段)。腫瘍中に形成された骨様硬組織の組織像(下段)。

以上の結果より、iPS 細胞から象牙芽細胞への分化誘導を行い、その際の重要な遺伝子を明らかとした。しかし、誘導可能であった細胞は少量であり、in vivo 実験において、象牙質塊形成に至らなかったと考えられた。今後、象牙芽細胞への誘導効率の上昇方法と、大量誘導培養系の確立が必要であると考えられる。

## 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4件)

1. Ser-Od, T., Yasumoto, M., Al-Wahabi, A., Nakajima, K., Murakami, S., Matsuzaka, K., Inoue, T. Effects of CO2 lasers on dental pulp biology in rats. *Photomedicine and laser surgery*, 34(4), 157-163, 2016.  
DOI: 10.1089/pho.2015.3997
2. Morikawa, T., Matsuzaka, K., Nakajima, K., Yasumura, T., Sueishi, K., Inoue, T. Dental pulp cells promote the expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, prostaglandin E 2 and substance P in mechanically stressed periodontal ligament cells. *Archives of Oral Biology*, 70, 158-164, 2016.  
DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.06.021
3. Nakajima, K., Oshima, M., Yamamoto, N., Tanaka, C., Koitabashi, R., Inoue, T., Tsuji, T. Development of a functional biohybrid implant formed from periodontal tissue utilizing bioengineering technology. *Tissue Engineering Part A*, 22(17-18), 1108-1115, 2016.  
DOI: 10.1089/ten.TEA.2016.0130
4. Tokita, R., Nakajima, K., Inoue, K., Al-Wahabi, A., Ser-Od, T., Matsuzaka, K., Inoue, T. Differentiation behavior of iPS cells cultured on PLGA with osteoinduction medium. *Dental Materials Journal*, 36, 103-110, 2017.  
DOI: 10.4012/dmj.2016-087

〔学会発表〕(計2件)

1. 井上健児, 松坂賢一, 村上聡, 國分克寿, 中島啓, Tungalag Ser-Od, Akram Al-Wahabi, 明石良彦, 鷺見正美, 井上孝 iPS 細胞分化誘導技術を応用した歯牙形成障害関連遺伝子の病態解析検査. 第9回日本口腔検査学会総会・学術大会, 2016年10月1-2日, 郡山市.

2. Nakajima, K., Inoue, K., Sumi, M., Akashi, Y., Matsuzaka, K., Inoue, T. Application of tooth germ on alveolar bone regeneration. 95th General Session & Exhibition of the IADR, March 22–25, 2017, San Francisco, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 啓 (NAKAJIMA, Kei)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20733463