

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20494

研究課題名(和文) ドラッグデリバリーシステムにiPS細胞を応用した垂直的骨造成技術の開発

研究課題名(英文) Development of vertical bone augmentation applying iPS cells to drug delivery system

研究代表者

萱島 浩輝 (Kayashima, Hiroki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50632121

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)：本課題で同定された小分子化合物は、通常の分化培養法と比較して、マウスiPS細胞の骨芽細胞分化を促進した。また、CAD/CAMにより作製した造成モールドおよび骨補填材を用いてラット頭蓋骨欠損部に垂直的骨造成を行った結果、造成部の骨再生が定量的に評価できるモデルとして有用であることを示唆した。さらに、同定した化合物を用いて分化誘導したマウスiPS細胞凝集体をマウス背皮下に移植した結果、iPS細胞の腫瘍形成を確認したものの、通常誘導と比較して腫瘍化を抑制した。化合物の濃度ならびに、培養方法などのプロトコルの改良を行うことで、自己由来細胞であるiPS細胞を用いた垂直的骨造成技術への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified a small molecule compound in this project, the molecule promoted osteoblast differentiation of mouse iPS cells. As a result of performing vertical bone augmentation on rat calvaria defects model using a CAD / CAM mold and bone graft material, it was suggested that this model is useful as for quantitatively evaluating the bone regeneration of bone augmentation area. Furthermore, transplantation of mouse iPS cell aggregates induced to differentiate using the identified compound was transplanted to the back of the mouse, and as a result, tumor formation of iPS cells was confirmed, but tumor formation was suppressed as compared with ordinary induction.

By improving the concentration of the compound and the protocol such as the culture method, it is expected that the application for using autologous iPS cells to vertical bone augmentation technology.

研究分野：歯科補綴学・再生医学

キーワード：再生医療 垂直的骨造成

1. 研究開始当初の背景

補綴・インプラント歯科治療において、安全かつ確実に骨欠損を再生する骨造成技術が求められている。申請者らは近年、個々の患者から作製可能な iPS 細胞が、新たな歯槽骨の再生医療技術として有用である可能性に着目してきた。一方、この技術を確立するための課題として、iPS 細胞の安全かつ確実な分化誘導法の確立および造成骨の骨吸収の抑制が挙げられる。

さらに近年、デジタルデンティストリーの進展により、患者個人の骨欠損部に合わせた立体的なスキャフォールドデザインを自在に設計すること(デジタルデザイン)が可能となった。この技術は、欠損部の垂直的な骨造成を支持するモールドの作製にも応用することができるだけでなく、設計されたモールドをもとに造成した骨の維持に関する経年的評価が可能となる。

以上の学術的背景から、申請者は、骨芽細胞分化を促進する化合物を用いて分化誘導した iPS 細胞と、ナノスケールの DDS 材料および CAD/CAM により作製した骨欠損部に合わせた骨造成モールドを用いて、垂直的骨造成を行い、さらに造成骨の経時的な評価することで、iPS 細胞が新たな骨移植材料として有用であることを示す大きな可能性を秘めていることに着目し、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケミカルバイオロジーとナノオーダーのドラッグデリバリーシステム(DDS)を基盤とした、iPS 細胞に適した骨芽細胞分化誘導法を確立し、これにデジタルデザインを応用することにより、造成後における骨補填材の評価をも可能とする骨造成技術を開発することで、新たな実験モデルの確立、さらにはバイオエンジニアリングの確立につなげていくことである。

(1) 申請者がこれまでに同定している候補小分子化合物を用いて、iPS 細胞を骨芽細胞へ分化誘導を行い、候補化合物から iPS 細胞の骨芽細胞分化を促進する化合物をスクリーニングする。

(2) CAD/CAM で作製したチタン製の骨造成モールドを用いて、頭蓋骨欠損ラットにおける垂直的骨造成モデルの検討および骨移植材の経時的な評価方法を検討する。

(3) 生体分解性ポリマーを用いた iPS 細胞由来骨移植材の作製モデルを確立する。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞の分化を促進する候補小分子化合物を骨芽細胞分化誘導培地に添加して iPS 細胞を培養し、化合物が、適切に作用する濃度検討を行ったうえで、実際に iPS 細胞の骨芽細胞分化に促進的に作用するか否かを評価した。分化の評価は、iPS 細胞が産生した石灰化基質の形成をアリザリンレッド染色法にて解析した。

(2) ラット頭蓋骨欠損モデルによる iPS 細胞の垂直的骨造成モデルを確立するため、CAD/CAM システムにより作製した 6mm の高さのチタンドームメンブレンおよび既存の骨補填材を用いて、ラット頭蓋骨欠損部における垂直的骨造成を行った。

(3) これまでに確立している三次元骨芽細胞分化誘導法に、同定した化合物を添加して分化誘導して作製した iPS 細胞移植体をフィブリンゲル内に包埋し、これをマウス背皮下に移植し、異所性の骨形成能を確認した。

4. 研究成果

(1)

同定された小分子化合物から、iPS 細胞および骨芽前駆細胞の分化および機能に及ぼす影響について、分子生物学的手法を用いてスクリーニングを行い、多角的に評価した結果、通常の分化培養方法と比較して、骨芽細胞への分化を有意に促進する化合物(ATM: Sodium aurothiomalate)が検出された($P < 0.05$) (図1)。

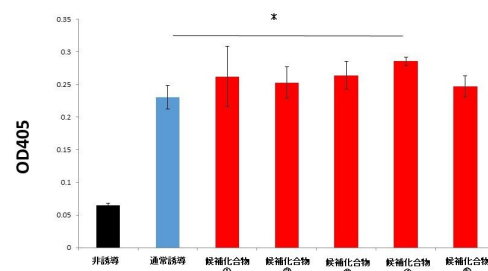


図1. 候補化合物が石灰化基質形成に及ぼす影響(アリザリンレッド染色)

(2)

また、垂直的骨造成に用いるチタン骨造成モールドを CAD/CAM を用いて作製し、このモールドおよび既存の骨補填材(-TCP)を用いて、ラット頭蓋骨欠損部における垂直的骨造成を行った結果、骨再生を組織学的ならびにマイクロ CT を用いて定量的に評価するモデルを確立することができた(図2および図3)。

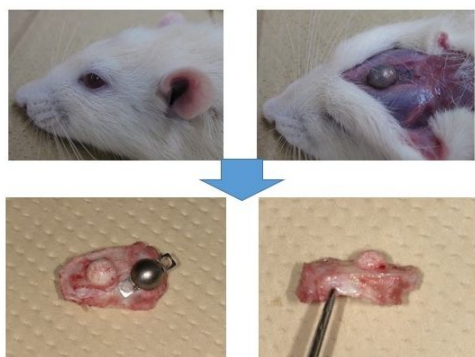


図 2 .
CAD/CAM で作製したチタンドームモールドおよび骨補填材を用いたラット頭蓋骨欠損モデルにおける垂直的骨造成

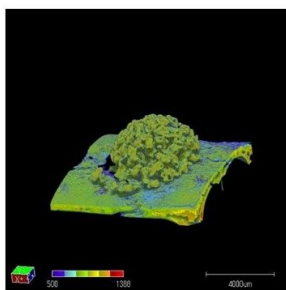
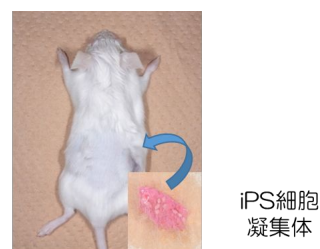


図 3 .
垂直的骨造成部のマイクロ CT 解析
(術後 8 週)

しかしながら、垂直的な骨造成が確認されたケースも認められたものの、創部裂開などの術後の副作用が多く生じるケースが多く認められた。ドームメンブレンのサイズに関する検討は必要ではあるが、今後の CAD/CAM チタンモールドを用いたラット頭蓋骨欠損における垂直的骨造成モデルは、骨移植材の評価に有用である可能性が示唆された。

(3)

スクリーニングによって同定した iPS 細胞の骨芽細胞分化を促進する化合物を用いて、マウス iPS 細胞を骨芽細胞へ分化誘導して作製した iPS 細胞凝集体をマウス背皮下に移植し、化合物が生体に与える影響について検討を行った。その結果、iPS 細胞の腫瘍形成が認められたものの、通常誘導と比較して、iPS 細胞の腫瘍化を大きく抑制することが確認された(図 4)。



通常誘導

化合物④

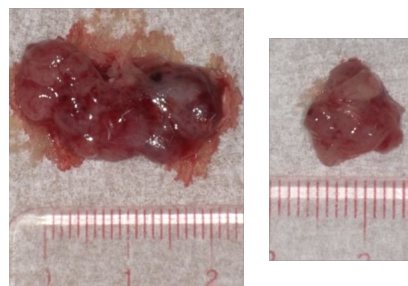


図 4 .
iPS 細胞凝集体の移植実験

今後、化合物の濃度ならびに、培養方法などのプロトコルの改良を行うことで、自己由来細胞である iPS 細胞を用いた新たな骨造成法として応用できる可能性があり、今後の研究の発展が期待される。

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 1 件)

1. Okawa H, Kayashima H, Sasaki J, Miura J, Kamano Y, Kosaka Y, Imazato S, Yatani H, Matsumoto T, Egusa H. Scaffold-Free Fabrication of Osteoinductive Cellular Constructs Using Mouse gingiva-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cells Int. 6240794, 2016.

[学会発表] (計 3 件)

1. 松岡秀、萱島浩輝、盛林昭仁、山本治毅、江草 宏、矢谷博文：骨髄由来間葉系幹細胞および iPS 細胞の骨芽細胞分化における PKC 阻害剤の影響 第 125 回 日本補綴歯科学会学術大会，2016 年
2. S. MATSUOKA, H. KAYASHIMA, A. MORIBAYASHI, H. YAMAMOTO, H. EGUSA, H. YATANI. Effects of PKC

Inhibitor on Osteogenic Differentiation
of Stem Cells. 95th IADR General
Session. (国際学会), 2017年

3. 盛林昭仁、萱島浩輝、江草 宏、矢谷博
文： $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体
が骨芽細胞分化に及ぼす影響 第126回
日本補綴歯科学会学術大会, 2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

萱島浩輝 (KAYASHIMA HIROKI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50632121