

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20619

研究課題名(和文)唇顎口蓋裂患者iPS細胞由来骨芽細胞を用いた低侵襲骨再生療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of iPS cells derived from cleft lip and palate patient and osteogenic differentiation.

研究代表者

加藤 宏 (Kato, Hiroshi)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10755036

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)：唇顎口蓋裂(CLP)患者で顎裂を有する者は正常歯列の獲得のために顎裂部に骨移植を行う必要がある。骨移植は腸骨海面骨の自家骨移植が第一選択とされているが手術侵襲は大きく、自家骨移植に代わる自己幹細胞を応用した低侵襲治療法の開発が強く期待される。そこで、本研究では低侵襲骨再生療法の開発を目的とし、CLP患者iPS細胞の樹立と骨芽細胞誘導を行った。in vitroの実験系においてiPS細胞の樹立は成功し、株化ヒトiPS細胞と同様に骨芽細胞誘導は可能であった。動物モデルにおける細胞移植実験では硬組織形成を認め、CLP患者iPS細胞由来骨芽細胞が骨再生療法の細胞源として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cleft lip and palate (CLP) patients have alveolar bone defects, they need bone graft that allows maxillary arch continuity. Autogenous particulate cancellous bone and marrow harvested from iliac bone is still the gold standard because of the osteogenic properties. However, it has the risk of complications, we expect less invasive procedures using iPS technology. In this study, I established human iPS cells from a patient with non-syndromic CLP and examined osteogenic differentiation of them. In animal models with iPS cells transplantation, some new bone tissues were observed in the bone defects. It is suggested these cells may contribute to new bone regenerative therapies.

研究分野：口腔外科

キーワード：iPS細胞 唇顎口蓋裂 骨再生 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂(CLP)患者で顎裂を有する者は正常歯列の獲得のために顎裂部に骨移植を行う必要がある。骨移植は腸骨海面骨の自家骨移植が第一選択とされているが、患者に与える手術侵襲は大きく、自家骨移植に代わる自己幹細胞を応用した低侵襲治療法の開発が強く期待される。iPS細胞は無限増殖能および多能性を有するため、近年では再生医療における材料としての注目を集め、実用化に向けた取り組みが加速している。そのため、iPS細胞を応用した骨再生療法の確立は唇顎口蓋裂患者にとって侵襲の少ない新たな治療法となりうる重要な研究課題である。

2. 研究の目的

これまでに申請者らはヒト iPS 細胞の効率的な骨芽細胞分化誘導法を確立し、報告を行ってきた。株化 iPS 細胞を骨芽細胞誘導する in vitro の実験系において、real time PCR 法にて骨芽細胞マーカーの発現、骨分化促進物質である活性型ビタミン D₃ への良好な反応性を有すること、アリザリンレッド染色にて陽性反応を示すことを明らかにしてきた。CLP 患者の iPS 細胞の樹立・骨芽細胞誘導の報告は未だにないため、本研究ではそれらの検討を行う。最終到達点としては、自家骨移植に代わる自己細胞由来 iPS 細胞を用いた低侵襲骨再生療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

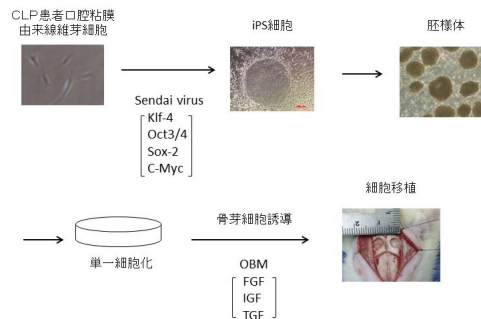
本研究では 1) CLP 患者由来 iPS 細胞の樹立と骨芽細胞誘導、2) 誘導骨芽細胞の実験動物への細胞移植の 2 つの研究を並行して行った。対象はインフォームドコンセントの得られた非症候群性の CLP 患者とした。

(1)CLP 口腔粘膜細胞は、全身麻酔手術時に生じた余剰口腔粘膜組織(歯肉組織)を用い、outgrowth 法により線維芽細胞を得た。得られた CLP 患者由来線維芽細胞にセンダイウィ

ルスベクターを用いて 4 因子

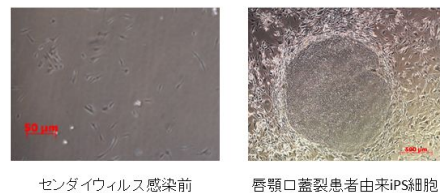
(Klf-4, Oct3/4, Sox2, c-Myc)を導入し、iPS 細胞の樹立を行った。樹立した iPS 細胞は未分化・多分化マーカー、胚様態形成、テラトーマ形成を行い iPS 細胞としての評価を行った。骨芽細胞誘導法はわれわれの骨芽細胞誘導法に準じて行った。

(2) 細胞移植実験はラット頭蓋骨の臨界サイズ欠損モデルを使用した。誘導骨芽細胞を骨欠損部へ足場材料としてアテロコラーゲンとともに填入した。アテロコラーゲンは骨欠損と同等のサイズで細胞数は 10⁵ 個で注入した。評価はマイクロ CT による画像評価、H-E (ヘマトキシリン-エオジン) 染色による組織学的な評価を行った。実験群はアテロコラーゲン単味群、アテロコラーゲン+細胞移植群の 2 群間比較検討を行った。

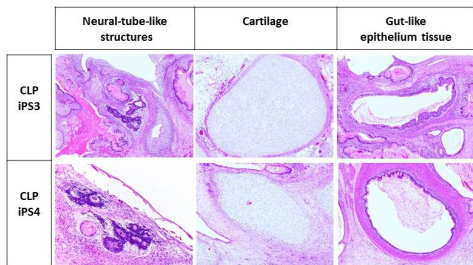


4. 研究成果

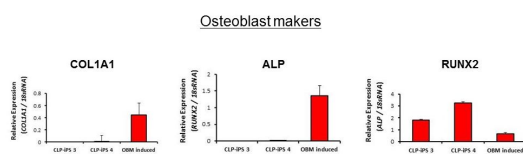
(1) センダイウィルス感染後 28 日でヒト ES 細胞様コロニーの出現を多数確認した。



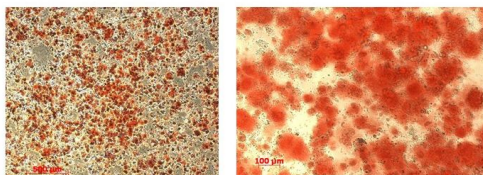
アルカリホスファターゼ (ALP) 染色にて陽性反応を示し、未分化・多分化マーカーは RT-PCR 法にて検出された。また、テラトーマ形成実験により組織学的に 3 胚葉分化が観察された。これらにより iPS 細胞の樹立が認められた。



得られた iPS 細胞は骨芽細胞誘導を 14 日間行ったところ、骨芽細胞マーカーであるタイプ コラーゲン、ALP の有意な発現上昇を認めた。ランクス 2 については発現上昇を認めなかった。



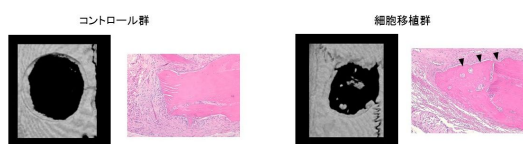
また、ALP 染色・アリザリンレッド染色でも陽性反応が認められた。骨芽細胞誘導を 30 日間と長期的に行ったところ、アリザリンレッド染色にて著明な陽性反応を示すことが認められ、硬組織形成能が示唆された。



アリザリンレッド染色

(2)ラット頭蓋骨への細胞移植実験において、マイクロ CT による画像評価にて、コントロール群は骨欠損部に硬組織様構造物を認めなかったのに対し、細胞移植群は硬組織様構造物を認めた。また、組織学的に細胞移植群では骨切断面からの新生骨形成ならびに切断面周囲の骨添加像を認めた。

(下図矢印)



今回の細胞移植実験では、想定していた骨再生は得られなかったため、今後細胞移植に適した骨誘導能を有する足場材料等の組み合

わせ検討が必要と考える。本研究では、助成研究資金の関係上、足場材料やサイトカインの組み合わせ実験を行うことができなかったため、今後の課題研究としたい。

以上により、今後足場材料や骨分化誘導物質の組み合わせのさらなる検討は必要ではあるが、CLP 患者 iPS 細胞由来骨芽細胞は新たな骨再生療法の細胞源として応用できる可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- 1) H Ochiai-Shino et al. J.Biol.Chem.287 (27) 2012, PLoS One. 2014 9(6):e99534
- 2) K Hayashi et al. BDJ Open. 2016 Jan 29;2:15007. doi: 10.1038/bdjopen.2015.7. eCollection 2016.

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 3 件)

- 1, Kato H, Watanabe A, Katsumi Y, Muramatsu K, Saito C, Matsunaga S, Shibahara T. Extirpation of recurred keratocystic odontogenic tumor in posterior maxillary sinus using Le Fort osteotomy after virtual operation with 3D model. Hospital Dentistry & Oral-Maxillofacial Surgery, 第 28 巻 1 号, P15-18, 2016

2, 加藤 宏

iPS 細胞から骨細胞様細胞への分化誘導における活性型ビタミン D₃ の促進作用
歯科学報, 第 117 巻, 第 4 号, P323-326, 2017

- 3, Saito A, Ooki A, Nakamura T, Onodera S, Hayashi K, Hasegawa D, Okudaira T, Watanabe K, Kato H, Onda T, Watanabe A, Kosaki K, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi

M, Sakamoto T, Yamaguchi A, Sueishi K, Azuma T.

Targeted reversion of induced pluripotent stem cells from patients with human cleidocranial dysplasia improves bone regeneration in a rat calvarial bone defect model.

Stem Cell Research & Therapy, 22;9(1):12,doi:10.1186/s13287-017-0754-4, 2018

〔学会発表〕(計 2 件)

1, Kato H, Hasegawa D, Watanabe K, Azuma T, Shibahara T.

Establishment of iPS cell derived from cleft lip and palate patient and osteogenic differentiation.

優秀ポスター賞

第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016 年 11 月 25 日, 千葉市

2, 奥平 貴人, 加藤 宏, 長谷川 大悟, 渡邊 豪士, 東 俊文, 柴原 孝彦

血液由来 iPS 細胞の樹立と骨芽細胞誘導

第 15 回日本再生歯科医学会

2017 年 10 月 21 日, 大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 宏 (Kato Hiroshi)

東京歯科大学・歯学部・

非常勤講師

研究者番号 : 10755036