

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11770

研究課題名(和文) iPS細胞由来間葉系幹細胞を用いた広域顎骨組織欠損再生に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for regeneration of wide-area mandibular bone defect using iPS cell-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

橋本 典也 (Hashimoto, Yoshiya)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20228430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚由来インテグレーションフリーiPS細胞を用いて異なるフィーダーフリーシングルセル培養液でiPS細胞由来間葉系幹細胞様細胞(iPSMSC)特性比較を行った。皮膚由来インテグレーションフリーiPS細胞から3種類のフィーダーフリー培養液を用いたiPSMSCの作製が可能であることが示唆された。3種類の中でも、DEF-CS500は、iPSMSCの誘導が早くiPSMSCを骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞のいずれにも分化させることができた。以上、フィーダーフリーシングルセル培養液で作製したiPSMSCの自己細胞組織工学の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムへの外来遺伝子の挿入を行わず作製したiPS細胞は腫瘍形成リスクが低い。本研究では、自己細胞組織工学のために皮膚由来インテグレーションフリーiPS細胞を用いて異なるフィーダーフリーシングルセル培養液でiPS細胞由来間葉系幹細胞様細胞(iPSMSC)特性比較を行った。フィーダーフリーシングルセル培養液で作製したiPSMSCの自己細胞組織工学の可能性が示唆された。本成果は、顎骨組織再生治療が実現すれば、次世代に残された課題と言われる広域顎骨組織欠損治療にむけた新たな基盤技術を提供することが可能となり、患者のQOLを大きく向上させる可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：We compared the characteristics of iPS cell-derived mesenchymal stem cell-like cells (iPSMSC) in different feeder-free single-cell cultures using skin-derived integration-free iPS cells. It was suggested that iPSMSC can be prepared from skin-derived integration-free iPS cells using three types of feeder-free culture medium. Among the three types, DEF-CS500 was able to induce iPSMSC quickly and differentiate iPSMSC into osteoblasts, chondroblasts, and adipocytes. In conclusion, the possibility of autologous cell tissue engineering of iPSMSC prepared with feeder-free single-cell culture medium was suggested.

研究分野：再生歯学

キーワード：iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ
 欠損補綴、顎顔面補綴においてはインプラントによる形態、機能回復が拡大傾向にある。このような状況の中で治療経過を大きく左右する要素として喪失した骨、軟組織をいかにインプラント治療に適した環境に改善するかという点に着目されており、現在の骨補填材に代わり、今後は細胞を用いた再生医療による安全で確実な骨増生が望まれている。

再生医療に用いる再生組織をあらかじめ工業的に大量生産して、必要時にいつでも利用可能にするには、培養系を用いた in vitro 組織再生が望ましい。山中らは 2007 年ヒトの線維芽細胞にごく少数の遺伝子を導入することによって多能性幹細胞である iPS 細胞を樹立した (Cell, 2007; 861-872)。iPS 細胞は従来の間葉系幹細胞に比較して無限に増殖する長所を有しており顎顔面補綴のような大きな欠損を治療するには適している。すでにマウス iPS 細胞では、骨分化因子を含む培養液を用い in vitro で骨芽細胞へ直接分化させる方法は行われている (STEM CELLS 2011; 206-216, PLoS ONE, 2013 e80026)。しかし、iPS 細胞から骨芽細胞へ分化させる際に分化が不完全で、未分化な iPS 細胞が混入することで腫瘍が形成されてしまうという臨床的リスクが伴う事、iPS 継代時にゲノム異常を誘発してしまい分化細胞がガン化するリスクが想定されている。現在、歯科再生医療で行われている細胞治療は骨髄間葉系幹細胞を採取し、骨芽細胞へと分化させ移植するという試みである。Hynes ら (JDR 2013;833-839) は皮膚の iPS 細胞から間葉系様幹細胞を作製し、ヌードラットの顎骨歯周組織欠損モデルに移植したところ新生骨量が増加したと報告している。今後、期待される治療技術であるが、臨床応用するには iPS の問題として挙げられるゲノム変異性リスクを評価する必要があり、評価の試みは、国内・国外ともに始まったばかりである。

2. 研究の目的

ゲノムへの外来遺伝子の挿入を行わず作製した iPS 細胞は腫瘍形成リスクが低い。申請者らはエピソードベクターを用いた歯肉由来のインテグレーションフリー iPS 細胞から安全な iPSMSLC を樹立した。この研究成果を発展させ、顎顔面領域再生のための臨床応用可能な iPSMSLC の作製法の規格化、iPSMSLC の骨芽細胞への分化誘導法の確立を行う。本研究では、自己細胞組織工学のために皮膚由来インテグレーションフリー iPS 細胞を用いて異なるフィーダーフリーシングルセル培養液で iPS 細胞由来間葉系幹細胞様細胞 (iPSMSLC) 特性比較を行った。

3. 研究の方法

皮膚由来 iPS 細胞 409B2 を使用した。409B2 の培養はフィーダー細胞上の培養から、3 種類の異なるフィーダーフリー培養液 (mTeSR1、DEF-CS500、StemFit AK02N) へ移行し、馴化後、間葉系幹細胞 (MSC) 誘導培養液下で行った (図 1)。細胞誘導はフローサイトメーターにて、MSC のマーカー、造血幹細胞のマーカーおよび未分化マーカーの表面抗原を測定し確認した。また、誘導過程におけるマーカーの変移も確認した。iPSMSLC の骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞への分化能を確認する為に、リアルタイム PCR にて初期マーカーの発現を測定した。

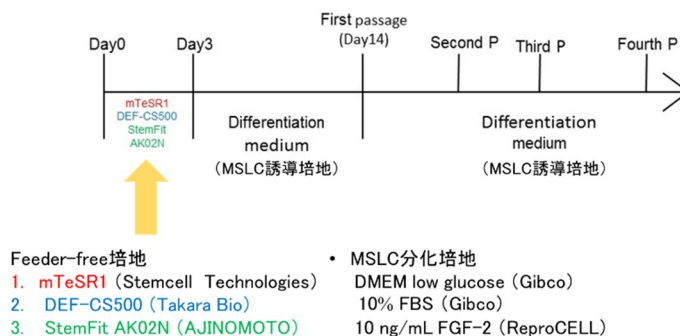


図 1.iPS 細胞から iPSMSLC への誘導

4. 研究成果

3 種のフィーダーフリー培養液による iPSMSLC への分化に差異は認められず、4 継代後、細胞形態は線維芽細胞様に変化し、間葉系幹細胞のマーカーは陽性、造血幹細胞・未分化マーカーは陰性であった (図 2、3)。3 種のフィーダーフリー培養液の培養条件で得られた iPSMSLC で骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞の初期マーカーの発現挙動に違いが見られた (図 4、5、6)。

本研究の結果より、皮膚由来インテグレーションフリー iPS 細胞から 3 種類のフィーダーフリー培養液を用いた iPSMSLC の作製が可能であることが示唆された。3 種類の中でも、DEF-CS500 は、iPSMSLC の誘導が早く、iPSMSLC を骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞のいずれにも分化させることができた (図 4、5、6)。以上、フィーダーフリーシングルセル培養液で作製した iPSMSLC の自己細胞組織工学の可能性が示唆された。

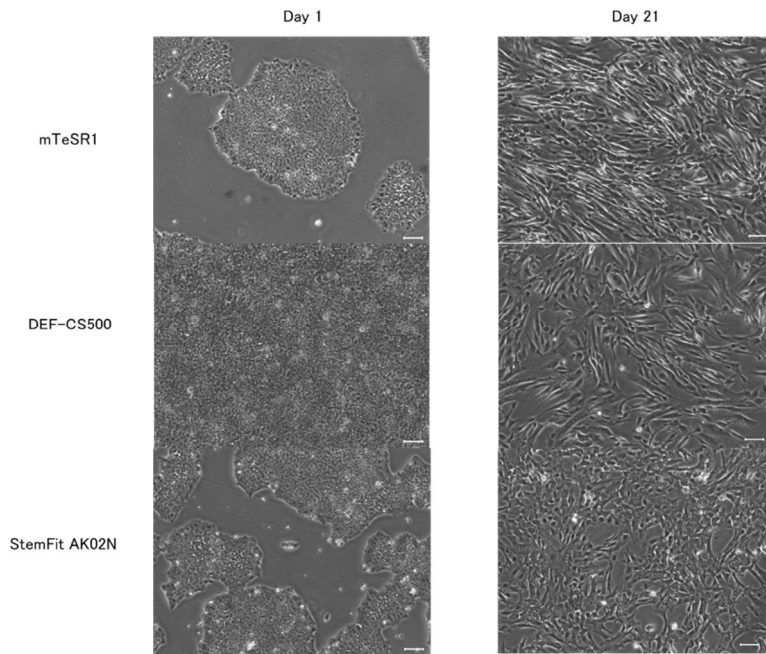


図 2.3 種のフィーダーフリー培養液による iPSMSC への分化

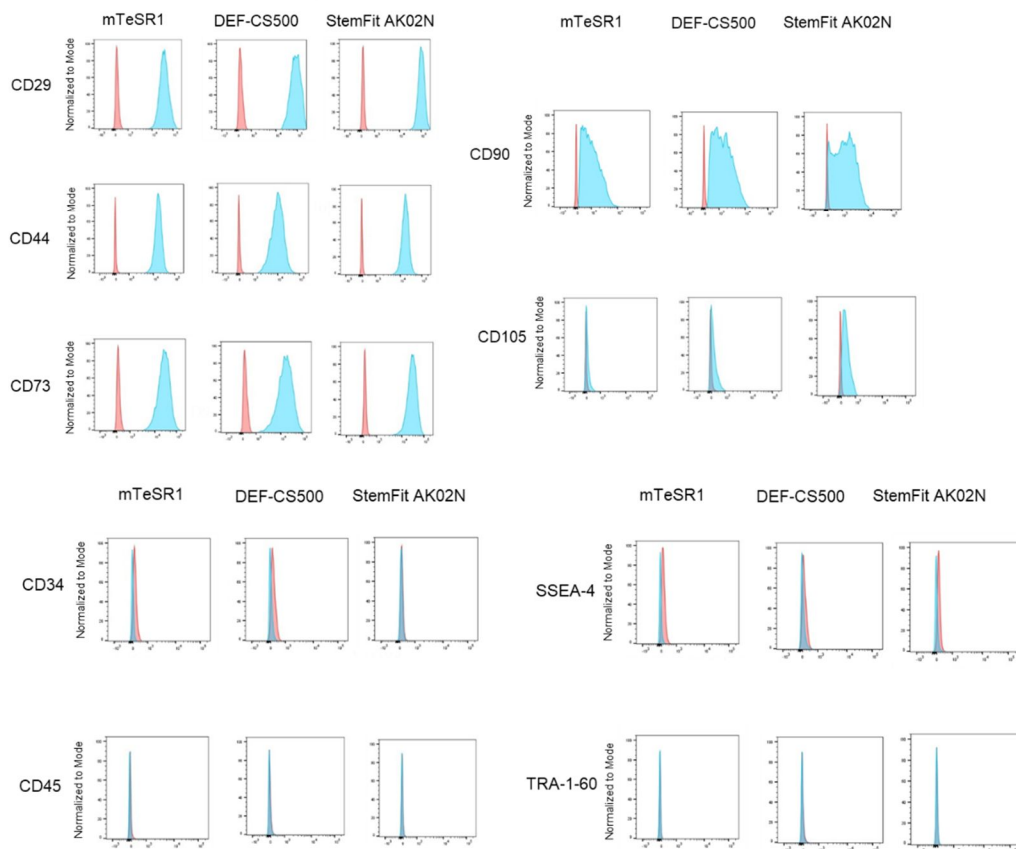


図 3. 間葉系幹細胞のマーカ、造血幹細胞、未分化マーカ-の発現

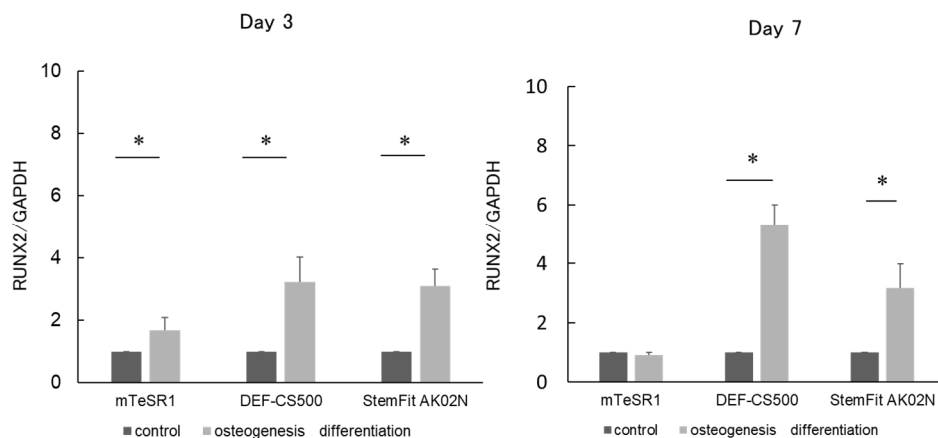


図 4.3 種のフィーダーフリー培養液で得られた iPSMSLC の骨芽細胞分化

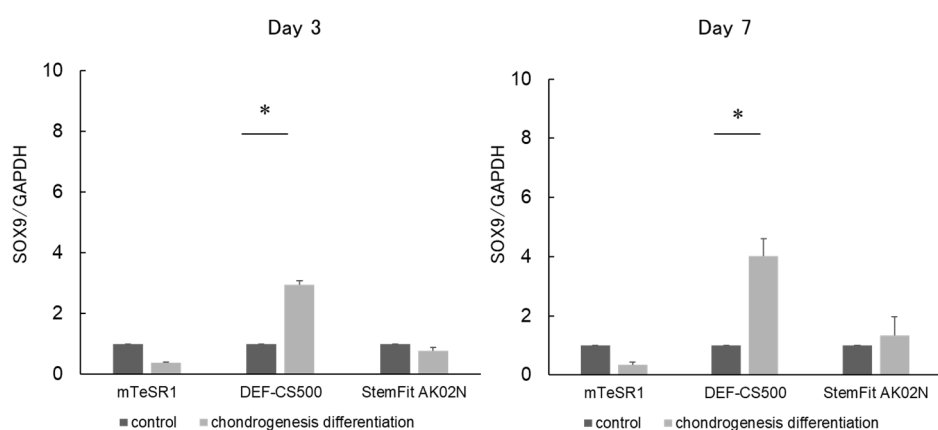


図 5.3 種のフィーダーフリー培養液で得られた iPSMSLC の軟骨芽細胞分化

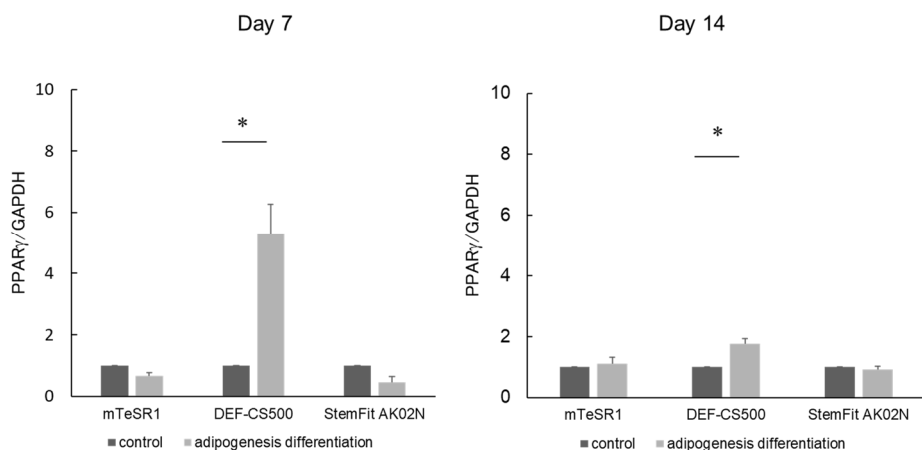


図 6.3 種のフィーダーフリー培養液で得られた iPSMSLC の脂肪細胞分化

現在、ゼノフリーでの iPS 細胞の培養および間葉系幹細胞 (iPSMSLC) への分化法を確立を行っている。具体的には腫瘍形成の原因となる c-Myc を使用せず、さらに遺伝子導入において染色体に組み込まれないエピソーマルベクターを用いて樹立されたフィーダーフリー iPS 細胞株を用い細胞培養にはゼノフリーであることが確認されている材料を使用し細胞培養および分化誘導を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ueda M, Hashimoto Y, Honda Y, Baba S, Morita S	4. 巻 52
2. 論文標題 Comparison of the characteristics of mesenchymal stem-like cells derived by integration-free induced pluripotent stem cells in different single-cell culture media under feeder-free conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 147-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-018-0211-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liao Wen, Hashimoto Yoshiya, Honda Yoshitomo, Li Peiqi, Yao Yang, Zhao Zhihe, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Accelerated construction of an in vitro model of human periodontal ligament tissue: vacuum plasma combined with fibronectin coating and a polydimethylsiloxane matrix	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e7036 ~ e7036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.7036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 HASHIMOTO Yoshiya, UEDA Mamoru, KOHIGA Yu, IMURA Kazuki, HONTSU Shigeki	4. 巻 37
2. 論文標題 Application of fluoridated hydroxyapatite thin film coatings using KrF pulsed laser deposition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 408 ~ 413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2017-122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuji NAKAYAMA, Yoshiya HASHIMOTO, Yoshitomo HONDA, Naoyuki MATSUMOTO	4. 巻 2
2. 論文標題 Induction of Mesenchymal Stem Cells-like Cells Derived from Human Gingival iPS Cells into Osteoblast-like Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Oral Tissue Engine	6. 最初と最後の頁 85-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11223/jarde.15.85	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Kosuke, Kubo Hirohito, Nakajima Masahiro, Honda Yoshitomo, Hashimoto Yoshiya	4. 巻 13
2. 論文標題 Bone Regeneration Using Rat-Derived Dedifferentiated Fat Cells Combined with Activated Platelet-Rich Plasma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5097 ~ 5097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13225097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Han Xiaoyu, Honda Yoshitomo, Tanaka Tomonari, Imura Kazuki, Hashimoto Yoshiya, Yoshikawa Kazushi, Yamamoto Kazuyo	4. 巻 13
2. 論文標題 Gas Permeability of Mold during Freezing Process Alters the Pore Distribution of Gelatin Sponge and Its Bone-Forming Ability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 4705 ~ 4705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13214705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 上田 衛、橋本 典也、本田 義知、馬場 俊輔、森田 章介
2. 発表標題 異なるフィーダーフリーシングルセル培養液を用いたインテグレーションフリーiPS細胞から誘導した間葉系幹細胞様細胞の特性比較
3. 学会等名 第8回臨床ゲノム医療学会 大阪学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 衛、橋本 典也、本田 義知、馬場 俊輔、森田 章介
2. 発表標題 異なるフィーダーフリー条件における皮膚由来iPS細胞からの間葉系幹細胞様細胞の誘導
3. 学会等名 第15回日本再生歯科医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田 衛, 橋本 典也, 本田 義知, 今井弘一
2. 発表標題 複数のフィーダーフリー培地を用いた皮膚由来iPS 細胞からの間葉系幹細胞様細胞の誘導
3. 学会等名 第71回日本歯科理工学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	馬場 俊輔 (Baba Shunsuke) (40275227)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	
研究分担者	本田 義知 (Honda Yoshitomo) (90547259)	大阪歯科大学・歯学部・准教授 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------