

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592228

研究課題名（和文）IPS細胞を用いた細胞ハイブリッド型人工骨による顎骨再建に関する基礎的研究

研究課題名（英文）

Bone regeneration around dental implants with artificial bone hybridized with iPS cells.

研究代表者

代田 達夫（SHIROTA TATSUO）

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：60235760

研究成果の概要（和文）：

低侵襲な骨の再生方法の確立を目的として、(1)骨髄由来の未分化間葉系細胞と人工骨を組み合わせた細胞ハイブリッド型人工骨による骨再生の可能性を検討した。次いで、(2)脂肪幹細胞の分化誘導の可能性を検討した。そして、(3)IPS細胞を用いた骨再生の基盤技術を確認することを目的として、iPS細胞の骨芽細胞への分化誘導に適した培養条件について検討し、骨芽細胞様細胞への分化誘導を確認した。

研究成果の概要（英文）：

To establish an effective method of the bone regeneration, we developed new artificial bone hybridized with bone marrow mesenchymal stem cells (1). Then, (2) we examined the possibility of the osteogenic and chondrogenic induction of adipose-derived stem cell. And (3), for the purpose of establishing a generic technology of the bone regeneration using the iPS cell, I examined a culture condition suitable for the differentiation instruction to the osteoblasts of induced pluripotent stem cells, and confirmed the differentiation instruction to osteoblaststic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生，骨芽細胞，iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

IPS細胞（Induced pluripotent stem cells）は、体細胞へ数種類の遺伝子を導入することにより、多くの細胞に

分化できる分化万能性と、分裂増殖を経てもそれを維持できる自己複製能を持たせた細胞である。しかし、IPSの実用化には多くの課題が残されてお

り、IPS に関する研究の大部分はまだ細胞レベルの基礎研究であるため、実際に移植した際の機能や高度な機能と構造を持った組織や臓器の再生に関しては不明な点が少なくない。

一方、顎口腔領域における骨再建では、従来、遊離骨移植、腸骨海綿骨細片移植、あるいは血管柄付き腓骨移植などが行われてきた。しかし、これらの再建法では移植骨採取に伴う新たな手術侵襲が加わることで、また、顎骨が有する複雑な3次元形態を再建することが困難であるなどの問題があった。

$\beta$ -TCP は生体内での吸収により新生骨と置換されるなどの特徴を有し、骨再生における Scaffold としても有望な生体材料と考えられている。したがって、 $\beta$ -TCP と未分化間葉系幹細胞や IPS 細胞などの培養増殖させた骨芽細胞とを組み合わせた細胞ハイブリッド型人工骨が実用化された場合には、複雑な3次元形態を有する顎骨を低侵襲で効果的に再建することが可能となると期待される。

しかし、未分化間葉系幹細胞や iPS 培養細胞などの培養条件など骨芽細胞へ確実に、そしてより効率的に分化誘導させる方法は確立されていないのが現状である。また、IPS 細胞から分化誘導させた骨芽細胞と骨補綴材とを組み合わせた細胞ハイブリッド型人工骨の作製法、ならびこの細胞ハイブリッド型人工骨を生体内に移植した際の骨再生過程については不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、低侵襲で効果的な骨の再生方法の確立を目的として、(1)骨髄由来の未分化間葉系細胞と  $\beta$ -TCP を組み合わせた細胞ハイブリッド型人工骨を作製し、この人工骨による骨再生の可能性について形態学的に検討した。次いで、(2)成熟脂肪組織由来の脂肪幹細胞 (ADSC) から骨芽細胞あるいは軟骨細胞を分化誘導することにより、骨再生医療に応用することを目的とし、骨芽細胞あるいは軟骨細胞への分化誘導の可能性を *in vitro* で検討した。そして、(3)IPS細胞を用いた骨再生の基盤技術の確立することを目的として、IPS細胞の骨芽細胞への分化誘導に適した培養条件につい

て検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞ハイブリッド型人工骨による骨再生に関する検討

ビーグル犬の大腿骨から骨髄を採取し、骨髄から得られた未分化間葉系細胞 (BMSC) を分離し、BMSC を骨芽細胞分化培地および脂肪分化培地中でそれぞれ6週間培養し、骨芽細胞化および脂肪細胞化を確認した。次いで直径3mm、厚さ1mmの円盤状に成型され、直径300 $\mu$ mの孔が37箇所形成した、ハニカム構造の  $\beta$ -TCP (以下37H) と BMSC を12時間遠心管内で培養したもの、および培養液中に rhBMP-2 5 $\mu$ g/ml を添加して培養したものをそれぞれ細胞ハイブリッド型人工骨とした。この人工骨を diffusion chamber 内に入れて同じビーグル犬の皮下に移植し12週間後に摘出して組織学的に解析した。

### (2) 脂肪幹細胞の骨芽細胞および軟骨細胞への分化誘導に関する検討

脂肪幹細胞 (ADSC) に BMP2, BMP7, PPAR の阻害剤である GW9662 を骨芽細胞誘導培地と共にそれぞれ、またはその全てを添加し化学的的刺激とした。同時に200rpmの振動を毎日1時間与え、機械的的刺激とした。培養7, 14および21日目の細胞について RT-PCR 法、および Western Blotting 法によって骨芽細胞ならびに軟骨細胞のマーカー遺伝子とタンパクの発現を解析した。さらに、細胞染色 ( ) クリスタルバイオレット、トルイジンブルー、アリザリンレッドおよびアルカリフォスファターゼ活性染色) および比色定量法によって、脂肪細胞、骨芽細胞、並びに軟骨細胞に関する分化形質発現を評価した。

### (3) IPS細胞を用いた骨再生の基盤技術の確立に関する検討

マウス (C57/BL6 系統由来) の皮膚細胞から作製された iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17) とマウス胎児線維芽細胞または種々の骨芽細胞 (UAMS-32, OP9, ST-2, RD-c6, POB など) との共存培養下で iPS の骨芽細胞への分化誘導を試み、分化に最も適した支持

細胞の種類について検討した。また、支持細胞と共存培養したiPS細胞ならびにESGRO Complete Basal Mediumの中で培養したIPS細胞に骨芽細胞への分化に必要な分化誘導因子（活性型ビタミンD3, デキサメタゾンなどを濃度別に添加し、骨芽細胞への分化誘導法について検討した。

#### 4. 研究の成果

##### (1) 細胞ハイブリッド型人工骨による歯槽骨再生に関する検討

BMSCを骨芽細胞分化培地、軟骨細胞分化培地および脂肪細胞分化培地において6週間培養した結果、それぞれの培地において骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への分化を確認できた(図1)。

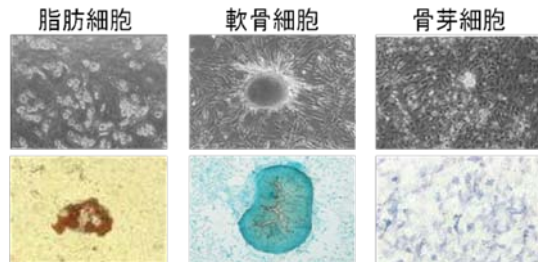


図1：BMSCの多分化能に関する検討

一方、骨芽細胞分化を行った細胞においてもRunx2およびosteocalcinのmRNAの発現が検出され、骨芽細胞への分化能が保持されていることが確認できた(図2)。

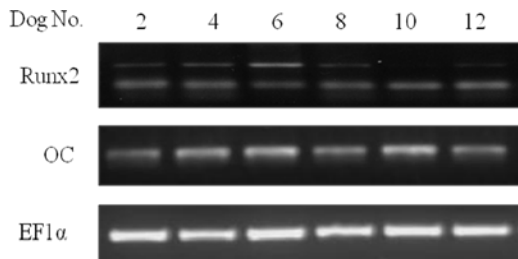


図2：BMSCにおける骨分化特異的遺伝子の確認

一方、ビーグル犬の皮下に細胞ハイブリッド型人工骨をdiffusion chamberを用いて移植した実験では、BMSCへBMP-2を添加して培養することにより、BMSCが骨芽細胞に分化し、β-TCPの気孔内に骨組織が形成

されることが明らかとなった(図3)。

##### Toluidine blue Alizarin red

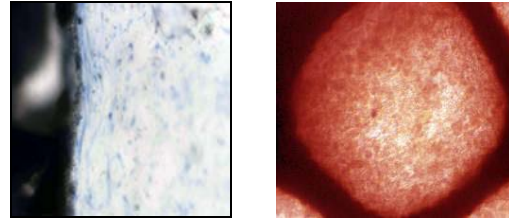


図3：皮下への埋入実験

##### (2) 脂肪幹細胞の骨芽細胞および軟骨細胞への分化誘導に関する検討

BMP2, 7を添加した群のマーカー発現および形質発現は、主に軟骨細胞様細胞への分化を示した。一方、GW9662を添加した群では主として骨芽細胞様細胞へ分化していた。さらに、BMP2, 7およびGW9662を共に添加した群では、両者の形質を同時に具有する細胞への分化を認めた。また、機械的刺激を与えた群は細胞増殖が顕著で、かつ、骨芽細胞および軟骨細胞への分化マーカー遺伝子の早期的・持続的発現を認め、両者の形質を同時に具有する細胞への分化が認められた(図4)。

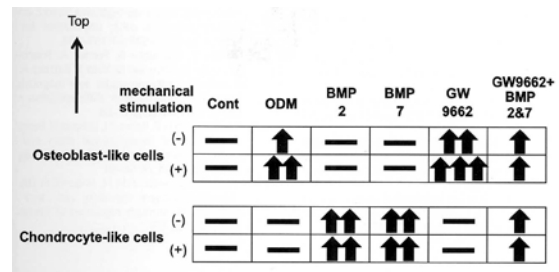
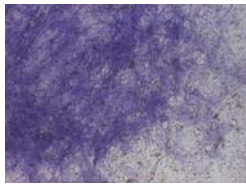


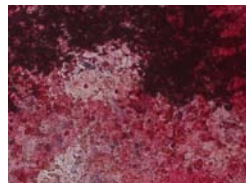
図4：骨芽細胞ならびに軟骨細胞への分化に対する物理刺激ならびに化学的刺激の影響

##### (3) IPS細胞を用いた骨再生の基盤技術の確立に関する検討

iPS細胞と骨芽細胞株(UAM-32細胞)との共存培養系で活性型ビタミンD3およびデキサメタゾンを添加して14週間培養したところ、アルカリフォスファターゼ陽性細胞が出現し、さらに3週間目には石灰化物が形成され、骨芽細胞様細胞への分化誘導が確認できた(図5)。



APase 染色



Alizarin red 染色

図 5: iPS 細胞の骨芽細胞様細胞への分化誘導

#### 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 2 件)

① Seika Banka, Yoshiki Mukudai, Yasuto Yoshihama, Tatsuo Shirota, Seiji Kondo, Seiji Shintani, A combination of chemical and mechanical stimuli enhances not only osteo- but also chondro-differentiation in adipose-derived stem cells、査読有、J Oral Biosciences Vol. 54、2012、pp188-195  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2012.10.0002>

② Kimitoshi Yagami, Tatsuo Shirota, Satoru Shintani, Mitsuori Mayahara, Mikio Nishizawa, Shigeru Yanagisawa, Rachel Sammons, Yoshinori Kuboki, Honeycomb form  $\beta$ -tricalcium phosphate induces osteogenesis by geometrical property with BMSC、Bio-Medical Materials and Engineering、査読有、Vol. 21、No. 5-6、2011、pp.291-306  
DOI:10.3233/BME-2012-0677

[学会発表] (計 3 件)

① 番家政香, 椋代義樹, 吉濱泰斗, 代田達夫, 近藤誠二, 新谷 悟: 脂肪幹細胞(ADSC)から骨形成細胞への分化に対する化学的, 機械的刺激の影響. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会、2011 年 7 月 29 日、大阪

② 八上公利, 西澤幹雄, 代田達夫, 定岡 直, 柳沢 茂, 中村浩志: Active hexose correlated compound は炎症性サイトカインによる NO 産生を抑制し, 間葉系幹細胞の骨芽細胞への初期分化を維持する. 第 65 回日本口腔科学会総会 2011 年 4 月 11 日、東京

③ 八上公利, 西澤幹雄, 代田達夫, 柳沢 茂: Active hexose correlated compound は炎症性サイトカインによる NO 産生を抑制し, 間葉系幹細胞の骨芽細胞への初期分化を維持する. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会、2011 年 7 月 29 日、大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

代田 達夫 (SHIROTA TATSUO)  
昭和大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 60235760

(2) 研究分担者

高見 正道 (TAKAMI MASAMICHI)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号: 80307058

佐藤 華 (SATO HANA)  
昭和大学・歯学部・普通研究生  
研究者番号: 50551222